

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA  
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMACOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE MODELOS COMPORTAMEN-  
TAIS NA BUSCA DE PLANTA PROMISSORA PARA PRODUÇÃO  
DE NOVOS PRODUTOS PARA ANSIEDADE E DEPRESSÃO NA  
INDÚSTRIA FARMACÊUTICA NACIONAL**

**CRISTIANE LOIVA REICHERT**

**FLORIANÓPOLIS – SC  
2011**



CRISTIANE LOIVA REICHERT

AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE MODELOS COMPORTAMEN-  
TAIS NA BUSCA DE PLANTA PROMISSORA PARA PRODUÇÃO  
DE NOVOS PRODUTOS PARA ANSIEDADE E DEPRESSÃO NA  
INDÚSTRIA FARMACÊUTICA NACIONAL

Dissertação de mestrado apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em Farmaco-  
logia da Universidade Federal de Santa Ca-  
tarina, como requisito parcial para obtenção  
do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Thereza Christina  
Monteiro de Lima

FLORIANÓPOLIS – SC  
2011



## ***DEDICATÓRIAS***

**Dedico este trabalho e o que ele representa às pessoas que amo acima de tudo e que sempre me apoiaram e me encorajaram em todos os momentos.**

**Meu pai, *Eduino*.  
Minha mãe, *Cladis*.  
Minha irmã, *Aline*.**



*“Você pode sonhar, criar e construir a idéia mais maravilhosa do mundo, mas são necessárias pessoas para fazer o sonho virar realidade.”*

Walt Disney





## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, a **Deus**, pela minha existência e oportunidade de conquistar os meus objetivos.

Ao meu pai **Eduino**, à minha mãe **Cladis** e à minha irmã **Aline**, pela amizade, amor, preocupação, apoio, ensinamento, confiança e pelas oportunidades que tenho hoje, devido ao esforço de vocês e por acreditarem em mim.

À professora Dra. **Thereza Christina Monteiro de Lima**, pela orientação e paciência durante este período. Agradeço também pela confiança que depositou em mim, pelo incentivo e aprendizado.

Ao meu noivo **Michel Salamanca Coelho**, pelo carinho, dedicação e apoio em todos os momentos. Por ter nos acompanhado até Foz do Iguaçu, na realização da coleta do material vegetal, pelos momentos de diversão e preocupação compartilhados a cada dia. E, principalmente, pela paciência e compreensão que teve durante os diversos dias que eu acordava de madrugada e ficava até altas horas da noite em frente ao computador escrevendo, sem poder te dar muita atenção. Agradeço também pela sua ajuda durante a etapa de coleta do material vegetal e demais atividades que estive envolvido, pelos momentos de alegria e preocupação.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação**, pelo conhecimento proporcionado durante as aulas.

À **Universidade Paranaense – UNIPAR**, por ter disponibilizado espaço e funcionários para o processamento do material coletado.

Ao Professor **Dr. Euclides Lara Cardozo Júnior**, pelo auxílio na escolha das plantas a serem coletadas. Pela ajuda ao escrever o projeto de pesquisa, e pela orientação quanto ao local e contatos para efetuar a coleta das plantas selecionadas.

À **Itaipu**, em especial ao Altevir e demais funcionários que nos auxiliaram na busca e coleta das plantas no Refúgio Biológico em Foz do Iguaçu.

À **Vandréia Andriolli e Taisa Dalla Valle Rorig**, pela ajuda nos dias de coleta e processamento do material vegetal coletado.

À **Guimar**, por dispor de seu tempo e nos acompanhar pelas estradas rurais e chácaras da linha Jacutinga, município de Vera Cruz do Oeste, em busca das plantas desejadas para serem coletadas.

À **Eloísa**, por encontrar a planta estudada, auxiliando na coleta e acompanhamento do desenvolvimento do cipó-cravo, e pelo conhecimento popular de utilização desta planta.

À **Mônica Bolson**, por ter disponibilizado seu trabalho para pesquisa de plantas candidatas ao trabalho, por ter levado e entregue a exsicata no Herbário da Universidade Federal do Paraná, além da troca de conhecimento durante a execução do trabalho.

À **Jaqueline Burigon**, que não conheço pessoalmente, mas que identificou a espécie através da exsicata entregue pela Mônica, e pela troca de informações através de inúmeros e-mails.

À equipe da **P&D Fitoterápicos** da empresa Prati, Donaduzzi Ltda (atualmente destivada) que auxiliaram na realização das análises fitoquímicas preliminares. Em especial, à **Cláudia Coutinho** e à **Michely Almeida**, por auxiliarem nas técnicas e análise dos resultados.

À **Vanessa Pires**, pelo auxílio em algumas dúvidas na metodologia e análise de resultados dos testes de modelos comportamentais.

Ao **Juliano Battisti**, do Departamento de Controladoria da empresa Prati, Donaduzzi Ltda, pela paciência em me ensinar alguns passos para que eu pudesse calcular os custos das atividades realizadas em meu trabalho.

À empresa **Prati, Donaduzzi Ltda**, pelo apoio financeiro, bolsa e por autorizar a utilização dos laboratórios para a realização de algumas atividades. E aos demais colaboradores desta empresa que me auxiliaram de alguma forma na execução do trabalho.

Aos **meus amigos e colegas do Mestrado Profissional em Farmacologia**, pela amizade e companheirismo nas atividades em sala e momentos de diversão. Em especial, à **Gisele de Lima Elias**, pela amizade, paciência e compreensão em todos os momentos.

À **Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC**, por disponibilizar estrutura e animais para que fosse possível realizar as avaliações dos efeitos *in vivo*, utilizando modelos comportamentais.

Às alunas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC, do Laboratório de Neurofarmacologia, **Evelyn C. S. Santos**, **Ana Paula R. Costa** e **Andressa Gazola**, por me ensinarem e auxiliarem na execução dos testes utilizando modelos comportamentais e nas dúvidas que tive ao realizar análise estatística dos mesmos.

À **Claudini H. de Pieri**, pela dedicação e auxílio na realização dos experimentos e por estar dando continuidade ao trabalho.

Aos demais alunos da UFSC com os quais tive contato e que me auxiliaram de alguma forma durante o período que estive na UFSC: **Ligia** (análise de estatística de convulsão por PTZ), **Filipe** (Any Ma-

ze®), **Alexandre** (programas de estatística), **Carize** (por ajudar nos experimentos), **Giliard** (fotos dos modelos comportamentais).

De forma geral, gostaria de agradecer a todos do laboratório de Neurofarmacologia e alunos de outros laboratórios da UFSC com quem tive contato, pelos momentos de descontração durante as duas semanas que passamos juntos.

À minha prima, **Leila Denise Kirch**, pela “pousada” durante os dias que estive em Florianópolis, e, juntamente, com meu tio **Jorge Kirch**, pelos passeios.

À **Marilha Daniela Marcola** e ao **Ronan D’Ávila**, pelas palavras de conforto e apoio nos momentos difíceis.

Enfim, a todas as pessoas próximas, amigos e demais familiares, que me acompanharam durante esta jornada e me apoiaram.



## RESUMO

### **Avaliação da aplicação de modelos comportamentais na busca de planta promissora para produção de novos produtos para ansiedade e depressão na Indústria farmacêutica nacional**

A busca por novos agentes terapêuticos inovadores, derivados de produtos naturais, aumentou significativamente na última década, principalmente as pesquisas destinadas para o tratamento de doenças psiquiátricas, dentre elas, a ansiedade e a depressão. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a possível atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato aquoso bruto de *Tynanthus micranthus*, em camundongos Swiss. A análise dos custos financeiros de todas as atividades envolvidas foi também realizada para verificar se a implantação desses modelos comportamentais na indústria farmacêutica é factível na busca por plantas promissoras para esta atividade. O material vegetal foi coletado, processado e submetido a reações colorimétricas e de precipitação, para a caracterização da fitoquímica preliminar. Em seguida, preparou-se o extrato bruto liofilizado, o qual foi administrado, pela via oral, em camundongos Swiss machos. Realizou-se o teste de triagem hipocrática (30 min - 10 dias) após a administração do extrato. Os animais tratados agudamente foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado, campo aberto, teste da chaminé, sono induzido por éter etílico, teste de esconder esferas, convulsão induzida por PTZ e por eletrochoque máximo corneal e suspensão pela cauda. A análise fitoquímica preliminar mostrou a presença de cumarinas voláteis, polifenóis, taninos, catequinas, flavonóides e saponinas, sendo alguns destes constituintes já relatados na literatura para esta espécie vegetal. O tratamento agudo com altas doses de EA, por via i.p. e v.o., no teste de triagem hipocrática, mostrou que a *T. micranthus* não é uma planta tóxica nas doses testadas. Além disso, foi possível observar um efeito analgésico em todas as concentrações e vias administradas. Nos testes de labirinto em cruz elevado, campo aberto e sono induzido por éter etílico foi possível observar uma tendência de efeito ansiolítico, sem efeito hipno-sedativo, para a dose de 100 mg/kg. Nos testes de convulsão induzida por pentilenotetrazol e por eletrochoque corneal foi possível observar uma tendência a um efeito anticonvulsivante para as doses de 300 e 600 mg/Kg, respectivamente. O teste da chaminé parece não ser um teste adequado para a avaliação do prejuízo motor, pois os animais apresentaram dificuldade em executar o teste por fatores fisiológicos. No teste de esconder esferas houve

uma tendência a um efeito positivo na concentração de 300 mg/Kg, indicando uma possível utilização para pesquisas de TOC, o mesmo ocorrendo para o teste de suspensão pela cauda (atividade antidepressiva). Quanto aos custos, o teste de triagem hipocrática apresentou um custo de R\$ 160,82, mostrando resultados importantes para a decisão das pesquisas a serem realizadas. O custo total foi de R\$ 4.233,73, demonstrando que a realização de testes comportamentais para a investigação de possíveis plantas promissoras para novos produtos representam uma ferramenta importante, mas que deve ser utilizada de forma consciente, para evitar desperdícios quanto à mão-de-obra, material aplicado e depreciação de equipamentos. As parcerias entre universidades e empresas podem ser uma medida alternativa viável para o desenvolvimento, a médio e longo prazo, de novos medicamentos fitoterápicos.

## ABSTRACT

### **Evaluation of the use of experimental behavioral models in the search for promising plant species to be used as new entities for the treatment of anxiety and depression in the National pharmaceutical industry**

The search for new and innovative therapeutic agents derived from natural products, have significantly increased in the last decade, particularly for treating psychiatric diseases, in special anxiety and depression, which are the main cause of disability. The present study aimed to investigate of the anxiolytic and antidepressant-like activities in mice acutely treated with *Tynanthus micranthus* aqueous extract by oral route. Moreover, we have performed a cost analysis of all activities involved in this evaluation in order to evaluate the feasibility of the use of behavioral models in the search for promising plants for these activities by the pharmaceutical industry. The plant material was collected, processed and subjected to colorimetric and precipitation reactions, to characterize the preliminary phytochemical profile. Then, the lyophilized extract was prepared and administered to Swiss male adult mice. We have carried out the Irwin's test after the administration of the extract (30 min -10 days). Animals acutely treated (1 h) were subjected to the tail suspension, elevated plus-maze, open field, chimney, ethyl ether-induced sleep and marble burying tests, besides in pentylenetetrazol-(PTZ) and maximal electroshock-induced (MES) convulsions. Preliminary phytochemical analysis showed the presence of volatile coumarins, polyphenols, tannins, catechins, flavonoids and saponins, some of them already reported in the literature. Acute treatment with high doses of aqueous extract (AE), i.p or p.o, showed no toxicity in the Hippocratic screening. Furthermore, we have observed an analgesic effect at all doses and routes of administration. In elevated plus-maze, open field and ethyl ether-induced sleep tests showed an anxiolytic-like profile of action, and in hypnosedative test did show any effect at 100 mg/kg. In PTZ- and MES-induced convulsions there was a trend of anticonvulsant effects at 300 and 600 mg/kg, respectively. The chimney test demonstrated not to be an appropriate test for the evaluation of motor impairment because the animals had difficulty performing the test due to physiological factors. In the marble burying test there was a trend of positive results at 300 mg/kg, indicating a potential use for OCD studies.

Regarding costs, the Hippocratic screening test showed a cost of R\$ 160.82, providing important results for a decision-making of the research to be conducted. The total cost was R\$ 4,233.73 demonstrating that the behavioral tests represent an important tool for investigating possible promising plants as putative new products, but they must be used consciously, in order to avoid waste of labor, material and equipment. Partnerships between universities and industries seem to be feasible and could be considered as an alternative to develop new herbal medicines in a medium-term.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Mapa representando a distribuição dos laboratórios de P&D Farmacêutico.....	5
<b>Figura 2</b> – Contribuição dos países desenvolvidos na P&D Farmacêutico de novos medicamentos. ....	6
<b>Figura 3</b> – Formas farmacêuticas de medicamentos fitoterápicos registradas na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).....	10
<b>Figura 4</b> - Representação, em termos de porcentagem quanto à localização das empresas detentoras de registro e da distribuição de registros de fitoterápicos na Anvisa, até março de 2008, por região do Brasil .....	12
<b>Figura 5</b> – Mercado farmacêutico de medicamentos por indicação, em 2009, subdivididos por área terapêutica.....	17
<b>Figura 6</b> – Doenças do SNC e sua representação, em %, do valor total de mercado.....	18
<b>Figura 7</b> – Imagens da planta <i>Tynanthus micranthus</i> Corr. Méllö ex K. Schum. ....	22
<b>Figura 8</b> – Estruturas da sépala e pétalas de <i>Tynanthus micranthus</i> . ...	23
<b>Figura 9</b> – Mapa demonstrando a distribuição geográfica no Brasil das plantas do gênero <i>Tynanthus</i> e das espécies <i>Tynanthus fasciculatus</i> e <i>Tynanthus panurensis</i> . ....	25
<b>Figura 10</b> – Mapa demonstrando a distribuição geográfica da espécie <i>Tynanthus micranthus</i> no Brasil e na América do Sul. ....	25
<b>Figura 11</b> – Produtos comercializados contendo planta do gênero <i>Tynanthus</i> .....	26
<b>Figura 12</b> – Estrutura básica das cumarinas. ....	30
<b>Figura 13</b> – Formação do ácido <i>cis</i> -o-hidroxicinâmico e <i>trans</i> -o-hidroxicinâmico a partir da dissolução da cumarina em meio alcalino.....	30
<b>Figura 14</b> – Composto $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagaloil- <i>D</i> -glicose, representando o padrão máximo de substituição alcançado nos taninos hidrolisáveis, originando os galotaninos e os elagitatinos. ....	32
<b>Figura 15</b> – Monômeros básicos de taninos condensados. ....	33
<b>Figura 16</b> – Estrutura básica das catequinas, sintetizadas a partir das leucoantocianidinas.....	34
<b>Figura 17</b> – Estrutura básica dos flavonóides.....	35

<b>Figura 18</b> – Reação da Cianidina como método para indicar a presença de flavonóides.....	35
<b>Figura 19</b> – Reação de Oxalo-bórica como método para indicar a presença de flavonóides do tipo flavonóis.....	36
<b>Figura 20</b> – Cátion flavílio, núcleo fundamental dos antocianos.....	39
<b>Figura 21</b> – Estrutura básica de quinona do tipo antraquinona (9,10-antraquinona).....	40
<b>Figura 22</b> - Estrutura básica de metilxantina e as principais metilxantinas.....	43
<b>Figura 23</b> - Comportamentos apresentados no labirinto em cruz elevado.....	52
<b>Figura 24</b> - Campo-aberto ( <i>open-field</i> ). ....	54
<b>Figura 25</b> - Teste da chaminé (chimney test). ....	55
<b>Figura 26</b> - Teste de esconder esferas (marble-burying test) ....	57
<b>Figura 27</b> - Sono induzido por éter etílico. ....	58
<b>Figura 28</b> - Convulsão induzida por pentilenotetrazol. ....	59
<b>Figura 29</b> – Representação da convulsão induzida por eletrochoque máximo. ....	61
<b>Figura 30</b> - Teste de suspensão pela cauda, representando imobilidade e agitação.....	62
<b>Figura 31</b> – Distribuição das etapas e atividades realizadas no presente trabalho, classificadas como Nível I ( <i>in vitro</i> ). ....	65
<b>Figura 32</b> - Distribuição das etapas e atividades realizadas no presente trabalho, classificadas como Nível II ( <i>in vivo</i> ). ....	65
<b>Figura 33</b> - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de <i>T. micranthus</i> (100- 600mg/kg) quanto às medidas comportamentais avaliadas em camundongos Swiss submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado.....	76
<b>Figura 34</b> - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de <i>T. micranthus</i> (100- 600mg/kg) quanto às medidas comportamentais (avaliação etológica) avaliadas em camundongos Swiss submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado.....	77
<b>Figura 35</b> - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de <i>T. micranthus</i> (100- 600mg/kg) quanto às medidas comportamentais (avaliação etológica) avaliadas em camundongos Swiss submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado.....	78
<b>Figura 36</b> - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de <i>T. micranthus</i> (100- 600mg/kg) quanto às medidas	

	comportamentais avaliadas em camundongos Swiss submetidos ao teste do campo aberto.....	81
<b>Figura 37</b>	- Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de <i>T. micranthus</i> (100- 600mg/kg) quanto às medidas comportamentais avaliadas em camundongos Swiss submetidos ao teste do campo aberto.....	82
<b>Figura 38</b>	- Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de <i>T. micranthus</i> (100- 600mg/kg) quanto às medidas comportamentais avaliadas em camundongos Swiss submetidos ao teste do campo aberto.....	83
<b>Figura 39</b>	- Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de <i>T. micranthus</i> (100- 600mg/kg) quanto às medidas comportamentais avaliadas em camundongos Swiss submetidos ao teste do campo aberto.....	84
<b>Figura 40</b>	- Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de <i>T. micranthus</i> (100 - 600mg/kg) no teste da chaminé.....	85
<b>Figura 41</b>	- Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de <i>T. micranthus</i> (100 - 600mg/kg) no teste de esconder esferas. ....	86
<b>Figura 42</b>	- Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de <i>T. micranthus</i> (100- 600mg/kg) na latência e na duração do sono em camundongos Swiss submetidos ao teste de sono induzido por éter etílico .....	88
<b>Figura 43</b>	- Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de <i>T. micranthus</i> (100- 600mg/kg) na latência e duração da primeira convulsão clônica em camundongos Swiss submetidos ao teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol .....	90
<b>Figura 44</b>	- Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de <i>T. micranthus</i> (100- 600mg/kg) no tempo de morte e severidade das convulsões em camundongos Swiss submetidos ao teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol .....	91
<b>Figura 45</b>	- Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de <i>T. micranthus</i> (100- 600mg/kg) no tempo de extensão das patas posteriores e tempo de recuperação das convulsões em camundongos Swiss submetidos ao teste de convulsões induzidas por Eletrochoque corneal.....	93

<b>Figura 46</b> - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de <i>T. micranthus</i> (100- 600mg/kg) na latência e no tempo de imobilidade em camundongos Swiss submetidos ao teste da suspensão pela cauda.....	95
<b>Figura 47</b> – Representação, em porcentagem, o peso de cada categoria de custo e de cada etapa no valor de custo total das atividades realizadas.....	98
<b>Figura 48</b> - Substâncias naturais produzidas pelo metabolismo primário e secundário.....	100

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Compostos extraídos de espécies vegetais que são utilizados na terapêutica .....	1
<b>Tabela 2</b> – <i>Ranking</i> , em 2009, de corporações farmacêuticas, quanto ao seu faturamento .....	7
<b>Tabela 3</b> - Espécies vegetais com maior número de derivados registrados como fitoterápicos simples .....	11
<b>Tabela 4</b> – Projetos de pesquisa de produtos naturais em diferentes estágios de desenvolvimento, distribuídos conforme a categoria terapêutica .....	19
<b>Tabela 5</b> – Espécies vegetais e seu uso popular (relacionado ao SNC) conforme pesquisa etnobotânica nos municípios de Foz do Iguaçu e Vera Cruz do Oeste, Paraná.....	20
<b>Tabela 6</b> – Relação entre reações cromáticas e a coloração obtida conforme o tipo de flavonóide presente na amostra analisada.....	37
<b>Tabela 7</b> – Diluição das soluções extrativas, representando a quantidade em mL de solução extrativa e água, por tubo de ensaio, para a realização do teste de permanência de espuma como indicativo para a presença de saponinas.....	46
<b>Tabela 8</b> – Fluxograma geral dos testes comportamentais realizados para a avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato bruto seco de folhas de <i>Tynanthus micranthus</i> .....	48
<b>Tabela 9</b> – Representação dos grupos, tratamentos, doses e vias de administração dos animais avaliados no teste de triagem hipocrática.....	50
<b>Tabela 10</b> – Descrição dos escores atribuídos conforme a severidade da convulsão, de acordo com a escada proposta por Czuczwar e Frey, em 1986.....	60
<b>Tabela 11</b> – Itens avaliados para cálculo de custos de mão-de-obra, material aplicado e depreciação contábil referente a cada etapa de atividades realizadas para a avaliação preliminar do EA de <i>Tynanthus micranthus</i> .....	69
<b>Tabela 12</b> – Avaliação fitoquímica preliminar das folhas de <i>Tynanthus micranthus</i> .....	71
<b>Tabela 13</b> – Principais efeitos observados, no teste hipocrático, em camundongos Swiss após tratamento agudo com EA das folhas de <i>Tynanthus micranthus</i> .....	73

<b>Tabela 14</b> - Número de animais tratados via oral com o EA das folhas de <i>T. micranthus</i> (100, 300 e 600mg/kg) que foram considerados com prejuízo motor após serem submetidos ao teste da chaminé. ....	86
<b>Tabela 15</b> – Custos de mão-de-obra, material aplicado e depreciação contábil referente a cada etapa de atividades realizadas para a avaliação preliminar do EA de <i>Tynanthus micranthus</i> . ....	97
<b>Tabela 16</b> – Resultados gerais encontrados para os testes realizados na avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do EA de <i>Tynanthus micranthus</i> , em tratamento agudo. ....	114

## LISTA DE ABREVIATURAS

<sup>14</sup>C – Carbono reativo

ABIFITO – Associação Brasileira da Indústria de Fitoterápicos

AEC – Extrato acetato de etila caule

AEF – Extrato acetato de etila folha

AER – Extrato acetato de etila de raiz

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BDZ – Benzodiazepínicos

C-C – carbono-carbono

CC – Extrato clorofórmico caule

CF – Extrato clorofórmio folha

CMED – Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos

CNS – Conselho Nacional de Saúde

COFID - Coordenação de Fitoterápicos, Dinamizados e Notificados

CR – Extrato clorofórmio de raiz,

DL50 - dose letal 50%

DZP - Diazepam

EA – Extrato aquoso bruto

ECM – Eletrochoque transcorneal máximo

EUA – Estados Unidos da América

FGTS - Fundo de Garantia por Tempo de Serviço

g – grama

GESEF – Gerência de Segurança e Eficácia

h – hora

HAC – Extrato hidroalcoólico caule

HAF – Extrato hidroalcoólico de folha

HAF – Extrato hidroalcoólico folha

HAR – Extrato hidroalcoólico de raiz

HC – Extrato hexano caule

HCl – Ácido clorídrico

HF – Extrato hexano folha

HR – Extrato hexano raiz

i.p – via intraperitoneal

IMI – Imipramina

KOH –hidróxido de potássio

LCE – Teste Labirinto em cruz elevado

M - molar

min - minutos

mL - mililitros

$\text{Na}^+$  - Sódio

OMS – Organização Mundial da Saúde

P&D – Pesquisa e Desenvolvimento

p/v – peso por volume

PTZ – Pentilenotetrazol

“R” – radical

SNC – Sistema Nervoso Central

v.o. – via oral

v/v – volume por volume

W - Watts

WHO – World Health Organization

$\Sigma$  - somatório



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
3.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	29
3.2	ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR .....	29
3.2.1	<i>Análise fitoquímica de cumarinas voláteis.....</i>	<i>29</i>
3.2.2	<i>Análise fitoquímica de polifenóis .....</i>	<i>31</i>
3.2.2.1	Análise fitoquímica de taninos .....	31
3.2.2.2	Análise fitoquímica de catequinas .....	33
3.2.2.3	Análise fitoquímica de flavonóides .....	34
3.2.2.4	Análise fitoquímica de heterosídeos antociânicos.....	38
3.2.2.5	Análise fitoquímica de antraquinonas .....	40
3.2.3	<i>Análise fitoquímica de alcalóides.....</i>	<i>41</i>
3.2.3.1	Análise fitoquímica de metilxantinas .....	42
3.2.4	<i>Análise fitoquímica de saponinas.....</i>	<i>44</i>
3.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO BRUTO.....	46
3.3.1	<i>Rendimento do extrato aquoso bruto.....</i>	<i>46</i>
3.4	ANIMAIS.....	46
3.5	ASPECTOS GERAIS.....	47
3.6	TESTE HIPOCRÁTICO OU TESTE DE IRWIN .....	50
3.7	TESTES COMPORTAMENTAIS – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E ANTIDEPRESSIVA.....	51
3.7.1	<i>Teste Labirinto em Cruz Elevado.....</i>	<i>51</i>
3.7.2	<i>Teste Campo Aberto .....</i>	<i>53</i>
3.7.3	<i>Teste da Chaminé .....</i>	<i>55</i>
3.7.4	<i>Teste de Esconder Esferas.....</i>	<i>56</i>
3.7.5	<i>Sono Induzido por éter etílico .....</i>	<i>57</i>
3.7.6	<i>Convulsões induzidas por pentilenotetrazol.....</i>	<i>59</i>

3.7.7	<i>Convulsões induzidas por Eletrochoque corneal</i> .....	60
3.7.8	<i>Teste Suspensão pela Cauda</i> .....	62
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
3.9	CÁLCULO DE CUSTOS DO PROJETO.....	63
3.9.1	<i>Custo de mão-de-obra direta</i> .....	66
3.9.2	<i>Custo do material aplicado</i> .....	67
3.9.3	<i>Depreciação contábil</i> .....	67
3.9.4	<i>Considerações gerais</i> .....	68
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>71</b>
4.1	ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	71
4.2	RENDIMENTO DO EXTRATO AQUOSO BRUTO.....	71
4.3	TESTE HIPOCRÁTICO OU TESTE DE IRWIN .....	71
4.4	TESTES COMPORTAMENTAIS – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E ANTIDEPRESSIVA .....	74
4.4.1	<i>Teste Labirinto em Cruz Elevado</i> .....	74
4.4.2	<i>Teste do Campo Aberto</i> .....	79
4.4.3	<i>Teste da Chaminé</i> .....	85
4.4.4	<i>Teste de Esconder Esferas</i> .....	86
4.4.5	<i>Sono Induzido por éter etílico</i> .....	87
4.4.6	<i>Convulsões induzidas por Pentilenotetrazol</i> .....	89
4.4.7	<i>Convulsões induzidas por eletrochoque corneal</i> .....	92
4.4.8	<i>Teste de suspensão pela cauda</i> .....	94
4.5	CÁLCULO DE CUSTOS DO PROJETO.....	96
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>124</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>133</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A origem dos medicamentos existentes no mercado atualmente é basicamente de síntese química ou de derivados da natureza como, por exemplo, pelo uso de extratos, frações ou isolamento de compostos ativos de plantas medicinais. O interesse na Natureza como fonte potencial de agentes terapêuticos está ainda presente nos dias de hoje. Os produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todos os fármacos em uso na clínica médica. As plantas superiores contribuem com 25% do total. Nos últimos 40 anos, ao menos uma dúzia de fármacos potentes derivaram de plantas, sendo alguns deles apresentados na Tabela 1 (GURIB-FAKIM, 2006; SOUZA, 2004).

**Tabela 1** – Compostos extraídos de espécies vegetais que são utilizados na terapêutica

ESPÉCIE	COMPOSTOS	FINALIDADE
<i>Dioscorea</i> spp	diosgenina e seus derivados	contraceptivos anovulatórios
<i>Rauwolfia</i>	reserpina e outros alcalóides	antihipertensivos e tranquilizantes
<i>Pilocarpus</i> spp.	pilocarpina	glaucoma e xerostomia (boca seca)
<i>Catharanthus roseus</i>	vincristina e vinblastina	agentes anticancerígenos
<i>Taxus brevifolia</i>	paclitaxel (Taxol®)	quimioterápico

Fonte: Gurib-Fakim (2006) e Souza (2004)

Desde a antiguidade, a população utilizava recursos da natureza (plantas, animais e minerais) como uma forma de tratamento para as doenças que os acometiam. A maior contribuição em termos de conhecimentos quanto à utilização de plantas medicinais foram registrados com os egípcios, alastrando-se para outras regiões do mundo (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008).

Por volta do século XVIII e XIX, químicos estudavam plantas medicinais consagradas até o momento, com a finalidade de extrair,

isolar e determinar a estrutura química de princípios ativos nas presentes (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008; PINTO et al., 2002).

Com a Revolução Industrial houve um avanço importante no que diz respeito à ciência e tecnologia. Após suspeitarem da presença de salicilatos na planta *Salix alba*, em 1829, foi possível isolar o primeiro composto derivado desta planta, a salicina. Anos depois, ocorreu a síntese do ácido salicílico e seu sal sódico a partir do fenol, e finalmente, em 1897, ocorreu a síntese do ácido acetilsalicílico, por Felix Hoffman, a partir do ácido salicílico, mantendo a propriedade analgésica desejada, menos ácido que do composto que o originou. Com isto, tem-se a primeira patente de medicamento conhecida, sendo o ácido acetilsalicílico o pioneiro dos fármacos sintéticos (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008; VIERGAS JR et al., 2006).

O conceito de mecanismo de ação do medicamento e receptores farmacológicos foi outro marco essencial para a criação de medicamentos sintéticos. Além disso, estudos de relação estrutura química e atividade biológica foi essencial para um planejamento racional de moléculas bioativas, e a disponibilidade de carbono reativo ( $^{14}\text{C}$ ) após a Segunda Guerra Mundial, tornou próspero o desenvolvimento de fármacos sintéticos, levando a um período de declínio em termos de investimento e interesse da indústria farmacêutica perante aos produtos naturais (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008; PINTO et al., 2002; VIERGAS JR et al., 2006).

A partir da Segunda Guerra Mundial, surgiram diversas indústrias farmacêuticas em vários países da Europa, e também nos Estados Unidos, as quais utilizavam os recursos da química sintética para ampliar as opções terapêuticas. Neste período é observado o surgimento de grandes corporações farmacêuticas multinacionais em diversos países (Estados Unidos, Japão, Alemanha, Suíça, Inglaterra e França), mas também o início das interações entre indústrias farmacêuticas, universidades de diversos países e institutos de pesquisas da Europa e Estados Unidos. A finalidade dessas interações era a de descobrir e desenvolver novos medicamentos utilizando recursos modernos de alta tecnologia para a época (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008).

No final da década de 1990, ocorreram importantes modificações no mercado farmacêutico. Com a entrada da lei de patentes (1996) e a política de medicamentos genéricos, o mercado farmacêutico de países em desenvolvimento foi favorecido, pois seria uma alternativa viável para reduzir a dependência externa, além do preço e custos dos medicamentos. Essas modificações, associadas ao avanço dos medicamentos genéricos nos principais mercados mundiais e o crescente custo

em P&D de novos medicamentos em grandes laboratórios multinacionais, fizeram com que a concorrência entre as grandes empresas ficasse mais intensa (MAGALHÃES et al., 2003; TORRES; SOUZA, 2010).

### **A Indústria Farmacêutica**

Com a intensa concorrência entre as empresas, torna-se necessário planejar estratégias para que estas permaneçam neste mercado. A competitividade das empresas não se relaciona somente com seu tamanho, mas também com suas capacidades tecnológicas (RADAELLI, 2006).

Na área farmacêutica, a inovação é fonte fundamental de competitividade entre indústrias com impactos na saúde pública e na biodiversidade em uma busca por novas fontes de conhecimento. Novos produtos e também novos processos são continuamente introduzidos nas práticas cotidianas das empresas. A indústria farmacêutica mundialmente investe cerca de 20% do seu faturamento das vendas em Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação, se destacando como uma das mais rentáveis e inovadoras dentre os setores produtivos (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008; RADAELLI, 2006; TORRES; SOUZA, 2010).

As inovações tecnológicas são consideradas como aquelas que se constituem de novos materiais e novos equipamentos, ou novas combinações a partir de elementos já existentes. As inovações de produto referem-se aos produtos introduzidos no mercado apresentando-se como novas e/ou melhoradas. Já as inovações de processo referem-se ao modo como os bens e serviços são produzidos, ou seja, alterações no processo capazes de aumentar a produtividade de uma determinada linha produtiva ou melhorarem a qualidade de um produto (RADAELLI, 2006). Existem também as inovações radicais que resultam de investimentos em P&D e que assumem o formato em novos produtos e/ou processos, o que possibilita a abertura de novos mercados e novas oportunidades de investimento (RADAELLI, 2006).

No que se refere a P&D, observa-se uma transformação nas grandes indústrias farmacêuticas. As mesmas estão descentralizando as suas atividades, estabelecendo laboratórios de pesquisas em novos locais em diferentes países. Ocorre um aumento no direcionamento destes laboratórios em direção a países em desenvolvimento, como China e Índia. Radaelli (2006) realizou um estudo com as principais empresas farmacêuticas Pfizer, GlaxoSmithKline, Novartis, Roche, Merck, Abbott Laboratories, Aventis e Eli Lilly, no qual foram investigadas as estratégias para se manterem competitivas no mercado. Foi observada a presença de vários laboratórios de P&D distribuídos principalmente nos

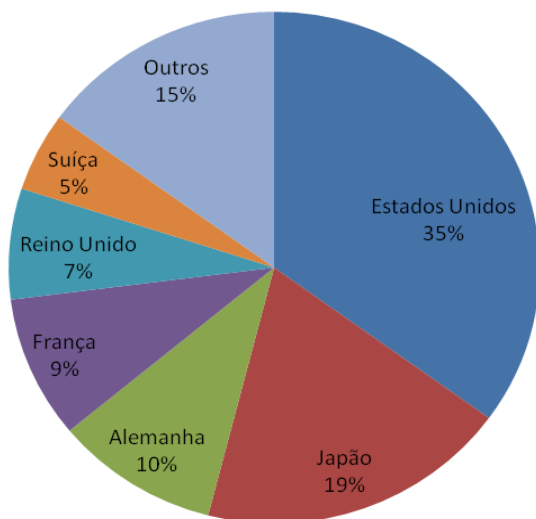
Estados Unidos, Europa e Japão, por razões estratégicas e econômicas no sentido de captar diferentes tipos de conhecimentos em lugares variados, conforme demonstrado na Figura 1. A presença desses laboratórios está relacionada com o seu local de origem (Pfizer, Abbott Laboratories, Eli Lilly e Merck são norte-americanas; GlaxoSmithKline é britânica; Novartis e Roche são suíças e o Aventis é formada com capital francês e alemão), pois para conquistarem o desejado sucesso no mercado internacional, as empresas precisam ser competitivas em seus mercados de origem. No Japão, apesar de não haver nenhum laboratório de origem japonesa, a presença de 13 laboratórios nesse local é justificada por questões de infra-estrutura e potencial científico, pois oferecem pessoal qualificado e boas condições para a instalação desses centros. Dos 13 laboratórios de pesquisa instalados nesse país, a maioria deles está direcionada para as pesquisas oncológicas e neurodegenerativas (RADAELLI, 2006).



**Figura 1** – Mapa representando a distribuição dos laboratórios de P&D Farmacêutico.  
Fonte: Radaelli (2006).

O principal objetivo para as empresas farmacêuticas é introduzir no mercado novos produtos para uma nova classe terapêutica ou ainda imitar e/ou melhorar aqueles existentes. E por apresentar este objetivo em comum que a competição entre as empresas é verdadeiramente global, mesmo quando a pesquisa e a produção se concentram em diferentes regiões (RADAELLI, 2006).

No que se refere à pesquisa e desenvolvimento de um novo medicamento, o investimento em pesquisa por parte da indústria é bastante alto, principalmente em função do longo tempo de desenvolvimento e dos riscos envolvidos (estimado atualmente em mais de 1 bilhão de dólares), ficando restritas a poucos países desenvolvidos. Além disso, cada uma dessas grandes empresas necessita lançar a cada ano entre 1 a 3 novas entidades químicas com vendas superiores a 1 bilhão de dólares anualmente. Esse fato tem levado a fusão das grandes corporações farmacêuticas mundiais, visando minimizar custos e maximizar seus lucros (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008). Na Figura 2, tem-se a representação de diferentes países com relação a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. Atualmente, observa-se que os Estados Unidos são os líderes absolutos, seguido do Japão, Alemanha, França, Reino Unido e Suíça (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008).



**Figura 2** – Contribuição dos países desenvolvidos na P&D Farmacêutico de novos medicamentos.

Fonte: Adaptado de Calixto e Siqueira (2008).



### O setor farmacêutico no Brasil

O desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional ocorreu com maior intensidade após fevereiro de 1999, com a aprovação da Lei 9.787, regulamentando a comercialização dos medicamentos genéricos. A partir deste instante, surgiram grandes empresas nacionais dedicadas quase que exclusivamente a comercialização dessa classe de medicamentos, e à criação de centros dedicados a pesquisa clínica, como os estudos de bioequivalência (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008).

O Brasil é o nono maior mercado de fármacos e medicamentos do mundo e conta com importantes indústrias do setor em seu território. A indústria nacional lidera as vendas no mercado interno e reforça os investimentos em pesquisa, devido ao crescimento dos genéricos. Entre as seis maiores empresas farmacêuticas do mundo, no que se refere à % de venda total no mercado, quatro são brasileiras e apresentam crescimento acelerado na produção de genéricos, conforme demonstrado na Tabela 2. Atualmente, existem cerca de 540 indústrias farmacêuticas cadastradas no Brasil, sendo 90 produtoras do medicamento similar. Os genéricos correspondem a 20,6% das vendas em unidades no conjunto do mercado farmacêutico brasileiro. (PORTAL BRASIL, 2010; CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008; TORRES; SOUZA, 2010).

**Tabela 2** – *Ranking*, em 2009, de corporações farmacêuticas, quanto ao seu faturamento

<b>RANKING</b>	<b>CORPORAÇÕES</b>	<b>US\$ MILHÕES</b>	<b>CRESC. %</b>
<b>1</b>	<b>EMS CORP</b>	953	11,8
<b>2</b>	<b>SANOFI - AVENTIS</b>	769	11,4
<b>3</b>	<b>ACHE</b>	701	14,5
<b>4</b>	<b>MEDLEY</b>	696	15,1
<b>5</b>	<b>NOVARTIS CORP</b>	552	5,4
<b>6</b>	<b>EUROFARMA</b>	489	26,6
<b>7</b>	<b>BAYER CORP</b>	483	1,8
<b>8</b>	<b>PFIZER</b>	374	0,6
<b>9</b>	<b>JOHNSON &amp; JOHNSON CO.</b>	348	3,4
<b>10</b>	<b>GSK CORP</b>	316	6,8
	<b>TOTAL DO MERCADO</b>	<b>12.360</b>	<b>11,6</b>

Fonte: Adaptado de TORRES e SOUZA (2010).

Apesar do grande incentivo à produção de medicamentos genéricos no Brasil, que correspondem a 20,6% das vendas em unidades no conjunto do mercado farmacêutico brasileiro, a fabricação de medicamentos de referência produzidos por indústrias estrangeiras ou multinacionais instaladas no Brasil ainda são superiores do que a produção de medicamentos genéricos e similares. Isso é um resultado do alto investimento em pesquisas nos centros de alta tecnologia localizados nas sedes destas empresas (PORTAL BRASIL, 2010).

Por estes e outros fatores, a indústria farmacêutica brasileira é considerada uma indústria de cópia, pois na sua grande maioria, adquirem matéria-prima e transformam em produto final (similares e genéricos) baseado em um produto já existente (referência). Os objetivos do incentivo à produção de medicamentos genéricos foram alcançados em alguns pontos, pois com a falta de investimento na área farmoquímica, que deveria ter ocorrido simultaneamente ao dos medicamentos genéricos, ainda dependemos do mercado externo para a compra de matéria-prima (Índia, China, Israel e Coréia). Além do mais, o Brasil encontra dificuldades na fiscalização das fábricas produtoras dessas matérias primas, condição essa que é de fundamental importância para o controle de qualidade e podendo interferir na credibilidade dos medicamentos genéricos (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008).

Perante todas as dificuldades que a indústria farmacêutica brasileira apresenta para se manter ativa, investimentos de forma a diversificar a linha de produtos ofertados ao mercado consumidor é um dos recursos utilizados. Do ponto de vista estratégico e lucrativo para a empresa farmacêutica, considerando a situação atual deste mercado, os fitoterápicos demonstram ser uma boa forma de investimento.

### **O mercado de fitoterápicos**

O interesse pelos medicamentos derivados de plantas, também conhecidos como fitoterápicos ou fitomedicamentos, tem aumentado expressivamente em todo o mundo, principalmente nos países desenvolvidos da Europa e nos Estados Unidos. O mercado mundial de fitoterápicos movimentou cerca de US\$ 14 bilhões de dólares anuais, sendo deste cerca de US\$ 3 bilhões somente na Alemanha, país que possui a mais desenvolvida indústria farmacêutica à base de vegetais, seguido pela França e Itália (ANVISA, 2010; CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008).

No Brasil, o mercado fitoterápico começou a se expandir recentemente, e, segundo estimativas da Associação Brasileira da Indústria de Fitoterápicos (Abifito), movimentou cerca de 500 milhões de dólares por ano (ANVISA, 2010). Os compostos derivados de plantas são atualmen-

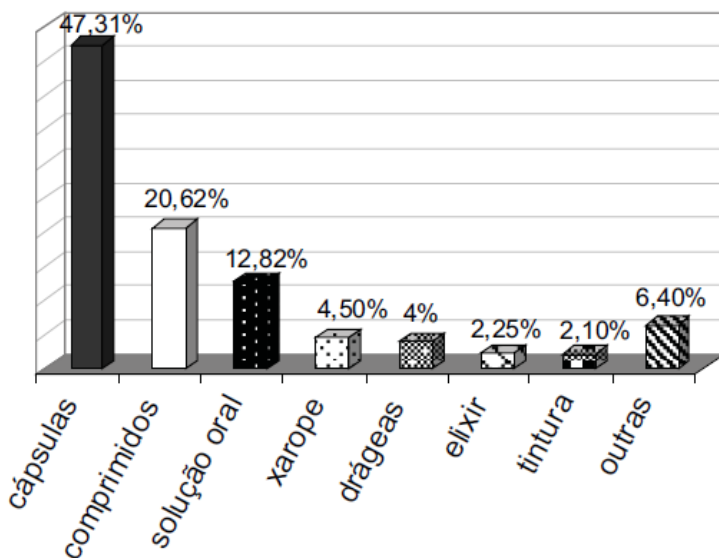
te empregados na terapêutica moderna sendo consumidos por cerca de 80% da população mundial. Além disso, eles apresentam um papel relevante para síntese de algumas moléculas mais complexas. Isso é notado quando se faz uma avaliação sobre os medicamentos disponíveis a terapêutica, pois cerca de 30% destes são derivados direta ou indiretamente de produtos naturais (principalmente plantas), podendo chegar até 60% quando se avalia somente os medicamentos utilizados para algumas doenças como o câncer (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008).

Quando se fala que os medicamentos fitoterápicos demonstram ser uma boa forma de investimento, é porque o mesmo apresenta uma taxa de crescimento de 15%, enquanto que para os medicamentos sintéticos esta taxa é de 4%. Além disso, o custo da pesquisa de fitoterápicos é menor, estando entre US\$ 3.000.000 a 7.000.000 (pesquisa a partir da etnofarmacologia, reduzindo o tempo necessário), quando comparado aos de síntese química, sendo em média um custo de US\$ 250.000.000 a 880.000.000 (RODRIGUES, 2005).

O Brasil apresenta uma grande perspectiva de crescimento para esta classe de medicamentos, pois o potencial da flora brasileira é indiscutível. Tem-se a maior biodiversidade do mundo, compreendendo mais de 55 mil espécies de plantas catalogadas de um total estimado entre 350 e 550.0000, aproximadamente um quarto de todas as espécies conhecidas. Com isso, cresce o interesse por parte dos pesquisadores brasileiros e pela indústria farmacêutica, em pesquisar as propriedades medicinais das plantas e desenvolver novos medicamentos (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008).

Além disso, do ponto de vista do conhecimento científico o Brasil também agrega vantagens nesta área do conhecimento. Em um levantamento baseado no número de trabalhos publicados em periódicos internacionais realizado no período entre 1984 a 2004, por Calixto (2005), demonstra que a pesquisa com plantas tem apresentado um rápido crescimento. O Brasil, México e Argentina são os países que apresentam números mais expressivos de publicações, sendo o Brasil o primeiro do ranking com 41,6%, seguido de 19,9% e 19,5%, respectivamente (RODRIGUES, 2005; CALIXTO, 2005; CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008).

Em estudo realizado por Carvalho e colaboradores (2008), foram encontrados 512 medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil, até março de 2008, nas diversas formas farmacêuticas. Destes 432 são simples e 80 associados, predominando sob as formas farmacêuticas sólidas, como cápsulas (47,1%) e comprimidos (20,62%), conforme ilustrado na Figura 3 (CARVALHO et al., 2008).



**Figura 3** – Formas farmacêuticas de medicamentos fitoterápicos registradas na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Fonte: Carvalho e colaboradores (2008)

Quanto às espécies vegetais dos fitoterápicos registrados na Anvisa, estas representam um total de 162 espécies. As espécies com maior número de derivados registrados são apresentadas na Tabela 2. Quanto à distribuição geográfica destas espécies é variada, sendo que algumas delas estão presentes em mais de um local. Em maior quantidade de espécies usadas como fitomedicamentos, 28,4% são asiáticas, 27,16% europeia, 25,92% da América do Sul (incluindo as espécies brasileiras), 19,75% da América do Norte e/ou Central e 8% África (a soma dos dados obtidos foi maior que 100%, pois algumas espécies vegetais estão presentes em mais de um local) (CARVALHO et al., 2008).

Como pode ser observado na Tabela 3, apenas 3 delas são espécies vegetais nativas. O fato de que menos de 30% são espécies nativas da América do Sul, demonstra a necessidade de investimentos em pesquisa envolvendo estudos de eficácia e segurança das espécies medicinais brasileiras, e no desenvolvimento de seus fitoterápicos (CARVALHO et al., 2008).

**Tabela 3** - Espécies vegetais com maior número de derivados registrados como fitoterápicos simples.

ESPÉCIE VEGETAL	Nº DE REGISTROS
<i>Ginkgo biloba</i> (Ginkgo)	33
<i>Aesculus hippocastanum</i> (Castanha da índia)	29
<i>Cynara scolymus</i> (Alcachofra)	21
<i>Hypericum perforatum</i> (Hiperico)	20
<i>Glycine max</i> (Soja)	20
<i>Valeriana officinalis</i> (Valeriana)	20
<i>Panax ginseng</i> (Ginseng)	17
<i>Cassia angustifolia</i> , <i>Cassia senna</i> e <i>Senna alexandrina</i> (Sene)	14
<i>Cimicifuga racemosa</i> (Cimicifuga)	14
<b><i>Mikania glomerata</i> (Guaco)</b>	<b>14</b>
<b><i>Maytenus ilicifolia</i> (Espinheira-Santa)</b>	13
<i>Peumus boldus</i> (Boldo)	13
<b><i>Paullinia cupana</i> (Guaraná)</b>	<b>12</b>

Em negrito estão representadas as espécies vegetais nativas do Brasil.

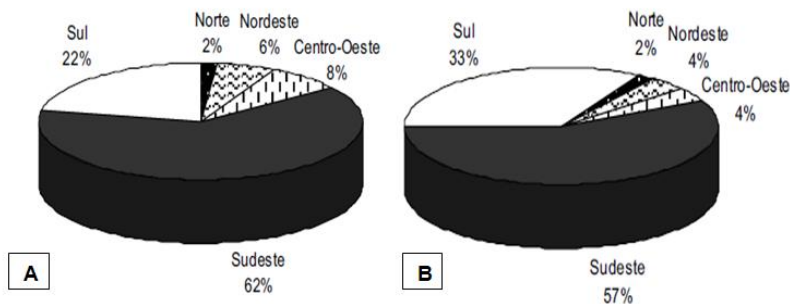
Fonte: Adaptado de Carvalho e colaboradores (2008)

Além das espécies vegetais com derivados registrados como fitoterápicos simples, até março de 2008, foram encontrados registros de 83 espécies vegetais cujos derivados possuíam registro exclusivamente como fitoterápico associado. São elas (em ordem alfabética): *Aconitum napellus*, *Adonis vernalis*, *Aloe ferox*, *Alpinia officinarum*, *Anacardium occidentale*, *Apodanthera smilacifolia*, *Artemisia absinthium*, *Baccharis genistelloides*, *Baccharis trimera*, *Berberis laurina*, *Caesalpinia ferrea*, *Carduus marianus*, *Carina brasiliensis*, *Carum carvi*, *Caryophyllus aromaticus*, *Casearia sylvestris*, *Cassia fistula*, *Centaurium erythraea*, *Cereus grandiflorus*, *Cereus peruvianus*, *Chamomilla recutita*, *Chondrodendron platyphyllum*, *Cinchona calisaya*, *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus aurantium*, *Citrus limetta* risso, *Cola nitida*, *Commyphora myrrha*, *Convolvulus scammonia*, *Coriandrum sativum*, *Davilla rugosa*, *Dorstenia multiformis*, *Echinacea pallida*, *Echinodorus macrophyllus*, *Erythrina mulungu*, *Eucalyptus citriodora*, *Foeniculum vulgare*, *Gentiana lutea*, *Gossypium herbaceum*, *Humulus lupulus*, *Hydrastis canadensis*, *Hyosciamus niger*, *Illicium verum*, *Jacarana caroba*, *Jateorhiza palmata*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus sabina*, *Lantana camara*, *Lavandula officinalis*, *Leptolobio elegans*,

*Luffa operculata*, *Marsdenia cundurango*, *Myrospermum erythroxylum*, *Myroxylon balsamum*, *Nasturtium officinale*, *Operculina macrocarpa*, *Passiflora alata*, *Peltodon radicans*, *Periandra mediterranea*, *Physalis angulata*, *Picrasma crenata*, *Pimpinella anisum*, *Pinus palustris*, *Piptadenia colubrina*, *Plantago major*, *Plumeria lancifolia*, *Polygala senega*, *Polygonum hidropiper*, *Ptychopetalum olacoides*, *Remijia ferruginea*, *Rheum officinale*, *Rheum palmatum*, *Roripa nasturtium*, *Ruta graveolens*, *Solanum paniculatum*, *Tamarindus indica*, *Trianosperma tayuya*, *Trichilia catigua*, *Uncaria gambir* e *Viburnum prunifolium* (CARVALHO et al., 2008).

Quanto às empresas detentoras de registro de fitoterápicos cadastradas, estas totalizam 119 empresas, sendo que 8,6% dos registros de fitoterápicos válidos pertencem a uma única empresa, e 43,8% são pertencentes as dez empresas com maior número de registros de fitoterápicos (CARVALHO et al., 2008).

Quanto à localização das empresas detentoras de registro e da distribuição de registros por região (Figura 4), observa-se uma grande concentração de empresas detentoras de registro na região Sudeste do país, seguida da região Sul, como também de número de registros concedidos para estas empresas, sendo ainda muito pequena a participação das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. A indústria de fitoterápicos está seguindo um padrão de desenvolvimento e distribuição semelhante ao da indústria de medicamentos sintéticos, por se concentrar nas regiões Sudeste e Sul do país (CARVALHO et al., 2008).



**Figura 4** - Representação, em termos de porcentagem quanto à (A) localização das empresas detentoras de registro e da (B) distribuição de registros de fitoterápicos na Anvisa, até março de 2008, por região do Brasil. Fonte: Adaptado de Carvalho e colaboradores (2008)

A provável causa para esta distribuição das indústrias farmacêuticas pode ser explicado pelo fato de que na região Sudeste concentra-se

as universidades públicas e centros de pesquisa, o que possibilitaria a aquisição de mão-de-obra especializada de modo mais rápido e facilitaria acordos de cooperação estas instituições. Além disso, a estrutura logística de transporte apresentada principalmente na região Sudeste, seguida pela região Sul, tanto para a importação de insumos farmacêuticos e equipamentos necessários para fabricação de produtos quanto para o escoamento da sua produção, contribui para a concentração dessas empresas nessas regiões, favorecendo o seu desenvolvimento (SALEN; KANNEBLEY JÚNIOR; PORTO, 2007).

Com a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), a proposta seria estimular a implantação da Fitoterapia nos Programas de Saúde Pública e incentivar à pesquisa e desenvolvimento do uso de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade nacional. A proposta é que, com esse incentivo, aumentasse o número de fitoterápicos registrados derivados de espécies vegetais nativas, com qualidade, segurança e eficácia comprovada, baseado em estudos pré-clínicos e clínicos, conforme legislação vigente (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008; CARVALHO et al., 2008).

### **Legislação de fitoterápicos**

Diversas normas regulamentam a produção de medicamentos, incluindo os fitoterápicos. As legislações publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), visando normatizar o registro e a adequação dos medicamentos fitoterápicos no país, é um exemplo da preocupação que se tem com este setor farmacêutico (ANVISA, 2010). O registro de medicamentos é o instrumento através do qual o Ministério da Saúde, no uso de sua atribuição específica, determina a inscrição prévia do produto no órgão ou na entidade competente, pela avaliação do cumprimento de caráter jurídico-administrativo e técnico-científico relacionada com a eficácia, segurança e qualidade destes produtos, para sua introdução no mercado e sua comercialização ou consumo (ANVISA, 2010).

A legislação brasileira apresentou diversas mudanças quanto a regulamentação de medicamentos. Em 1967, foi criada uma regulamentação específica, a Portaria nº 22. Deste ano até 1994, esta portaria ficou em vigor, sendo em 1995, substituído pela Portaria nº 06. A partir de então, as alterações feitas na legislação foram feitas em menor período de tempo. Em 2000, foi publicada a RDC nº 17; em 16 de março de

2004, a RDC nº48 e por fim, em 05 de abril de 2010, a RDC nº 14 que encontra-se vigente até os dias atuais (ANVISA, 2010).

Segundo a RDC nº 14/10, o medicamento fitoterápico deve apresentar eficácia e segurança validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. Pelo fato da RDC nº14/10 ser bastante ampla, devido aos assuntos abordados quanto aos fitoterápicos, têm-se normas complementares, algumas exclusivas a este tipo de medicamentos, sendo elas: a IN nº 05/10 (“Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos”); a IN nº05/08 (“Lista de fitoterápicos de registro simplificado”); RE nº90/04 (“Guia para realização dos testes de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”) e a RE nº91/04 (“Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de fitoterápicos”) (ANVISA, 2010).

No que se refere ao registro, bulas, embalagens e nome comercial, publicidade, estudos de estabilidade, validação de metodologias analíticas e bioanalíticas de medicamentos, os medicamentos fitoterápicos seguem os mesmos princípios do que os demais medicamentos. Para os estudos de estabilidade e validação para medicamentos fitoterápicos, devido à complexidade de sua composição, pela necessidade de se estabelecer marcadores químicos, entre outros, a ANVISA disponibiliza em seu site, orientações específicas, facilitando o entendimento dos critérios exigidos para o registro de medicamentos fitoterápicos (ANVISA, 2010).

### **Comprovação de segurança e eficácia de medicamentos fitoterápicos**

Um critério obrigatório para o registro de fitoterápicos é a comprovação da sua segurança e eficácia. Para isso, de acordo com a RDC nº14/10 e o COFID, as empresas poderão realizá-las de diferentes formas, conforme descrito abaixo:

*Alternativa 1* - É a obtenção de pontuação definida a partir da apresentação de estudos farmacológicos e toxicológicos presentes nas obras contidas na “Lista de Referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos”, publicada como IN nº 05/10. Essa norma disciplina a utilização de artigos científicos e monografias publicadas sobre a espécie que se pretende registrar para comprovar segurança e eficácia. No mínimo, a metade dos artigos apresentados deve ser sobre ensaios clínicos. Os estudos citados têm que se referir ao derivado específico que se pretende registrar e apresentar as mesmas indicações



solicitadas para o produto em dosagens semelhantes às testadas no estudo;

*Alternativa 2* - Uma segunda forma possível para a comprovação de segurança e eficácia é a apresentação de estudos pré-clínicos e clínicos, como ocorre com os medicamentos novos registrados na ANVISA. Os fitoterápicos possuem um guia para ensaios toxicológicos pré-clínicos específicos, a RE nº 90/04, que estabelece os critérios mínimos aceitáveis para o estudo toxicológico agudo, sub-crônico e crônico, os testes para medicamentos de uso tópico e o estudo especial de genotoxicidade. Para os estudos clínicos, devem ser seguidas as determinações do Conselho Nacional de Saúde (CNS), através das Resoluções nº 196/96 e 251/97, além da RDC nº 39/2008. Deve ser solicitada anuência para a realização da pesquisa clínica junto a Gerência de Segurança e Eficácia (GESEF) da ANVISA.

*Alternativa 3* - Outra forma possível é a apresentação de levantamento bibliográfico etnofarmacológico, mostrando eficácia e segurança do produto que tenha uso comprovado por um período igual ou superior a 20 anos. Nesse caso, é necessário considerar o tempo de uso proposto para o medicamento, que deve ser episódico ou curto, e uma busca detalhada por substâncias químicas potencialmente tóxicas ao usuário. É necessário ainda apresentar comprovação de que o produto não é potencialmente tóxico, sendo para isso solicitado um teste de toxicologia pré-clínica.

*Alternativa 4* - Existe ainda uma lista de espécies vegetais de registro simplificado, publicada como IN nº 05/08, que contempla 36 espécies vegetais para as quais é dispensada a comprovação de eficácia e segurança, considerando a quantidade de estudos que já foi publicado sobre cada uma dessas espécies. Se o solicitante do registro seguir todos os parâmetros especificados na lista citada, que são: parte da planta, forma de uso, quantidade de marcador, indicações, via de administração, dose diária e restrições de uso, fica dispensada a apresentação de comprovação de eficácia e segurança no processo de registro (ANVISA, 2010).

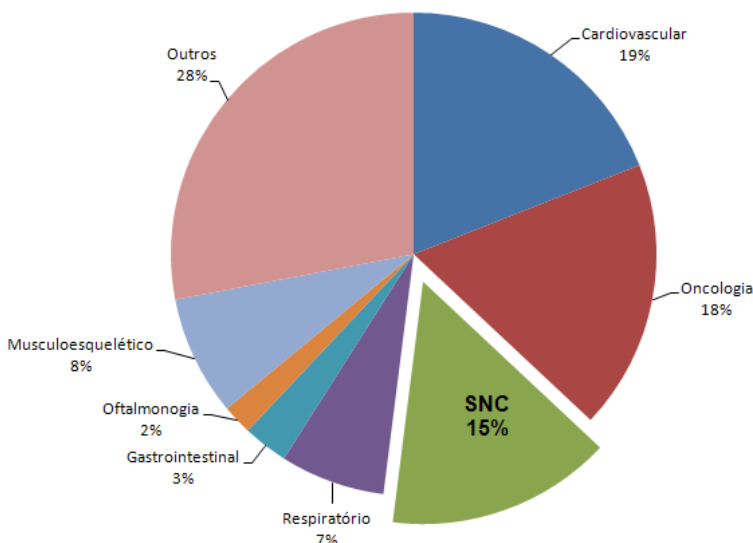
### **Medicamentos e Sistema Nervoso Central**

Como comentado anteriormente, os produtos naturais têm servido de inspiração para o desenvolvimento de vários produtos pela química orgânica nos últimos tempos. A avaliação de extratos e de compostos derivados de plantas, e que apresentam atividade promissora, servem como um caminho para o avanço de metodologias de síntese e a possibilidade de fabricação de análogos do composto original, melhorando seus

aspectos farmacológicos e farmacêuticos (HARVEY, 2008), buscando sempre uma maior eficácia e menos efeitos adversos. Na última década, houve um aumento significativo na busca de novos agentes terapêuticos originados de plantas medicinais para doenças psiquiátricas (ZHANG, 2004). Isto pode ser explicado pela importância que os distúrbios mentais e neurológicos apresentam atualmente.

Dados referentes à prevalência de distúrbios neurológicos e mentais em nível mundial têm preocupado a comunidade internacional. Segundo a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* – WHO/OMS), estima-se que os transtornos mentais e neurológicos sejam responsáveis por cerca de 1% das mortes, tornando-os problemas prioritários de saúde no mundo todo. O prolongamento da expectativa de vida e o envelhecimento da população em geral nos países desenvolvidos e em desenvolvimento levam a um aumento na prevalência de doenças crônicas e progressivas (WHO, 2006; WHO, 2007).

As áreas terapêuticas de cardiovascular, oncologia e SNC representaram mais de 50% do mercado total de medicamentos por indicação. Os três segmentos terapêuticos representaram 52% do mercado farmacêutico total. A área de cardiovasculares responderam por 19% da quota total de mercado, seguido pela oncológica, com 18% e do SNC, com 15% de participação no mercado farmacêutico total, conforme demonstrado na Figura 5 (GBI RESEARCH, 2010).



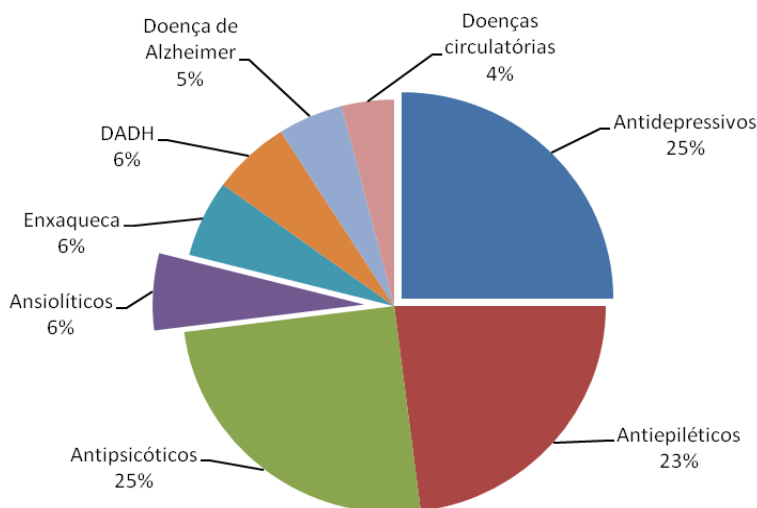
**Figura 5** – Mercado farmacêutico de medicamentos por indicação, em 2009, subdivididos por área terapêutica. Fonte: GBI Research (2010).

A elevada quota do mercado farmacêutico pelas áreas terapêuticas de doenças cardiovasculares, oncologia e SNC, indica que estas áreas terapêuticas irão decidir o caminho a ser seguido pela indústria farmacêutica global. A maioria das empresas farmacêuticas trabalham nestas três áreas terapêuticas e seus esforços tem sido para aumentar e consolidar o seu portfólio nessas áreas terapêuticas (GBI RESEARCH, 2010).

Dentre as doenças do sistema nervoso central, podemos citar a depressão e a ansiedade, como doenças primárias ou secundárias a outras patologias, centrais ou não. De acordo com a OMS (2007), dessas, a depressão apresenta maior destaque, uma vez que é classificada como a principal causa de incapacidade mundial e afeta cerca de 120 milhões de pessoas no mundo inteiro em diferentes faixas etárias.

A indústria farmacêutica de drogas para o Sistema Nervoso Central é a segunda maior indústria terapêutica, representando um valor total de mercado de \$ 56 bilhões nos EUA. Os medicamentos para o SNC são drogas capazes de produzir efeitos psicológicos e fisiológicos através de diferentes tipos de mecanismos. Considerando somente o mercado de SNC, antidepressivos, antipsicóticos e anti-epilépticos são os maiores segmentos, conforme demonstrado na Figura 6, com uma

quota de mercado de 25%, 25% e 14%, respectivamente (WIKINVEST, 2010).



**Figura 6** – Doenças do SNC e sua representação, em %, do valor total de mercado.

Fonte: Wikinvest (2010)

Apesar da importância que os distúrbios neurológicos e mentais apresentam no contexto mundial, quando comparado as outras áreas terapêuticas estudadas, observa-se que os projetos de produtos naturais nas áreas de câncer e anti-infecciosos apresentam predominância, conforme demonstrado na Tabela 4. Essa preferência por outras áreas terapêuticas é confirmada pelo fato de se ter poucos produtos em fase de pré-registro para a área terapêutica da neurofarmacologia (HARVEY, 2008).

Atualmente, o número de trabalhos científicos que estudam e comprovam o efeito ansiolítico e/ou antidepressivo de plantas medicinais utilizados popularmente é muito grande. Entretanto, pouquíssimos destes trabalhos são desenvolvidos ao ponto de se tornarem medicamentos fitoterápicos, produtos com valor agregado maior. Na ANVISA, são encontrados registros de alguns medicamentos fitoterápicos classificados de acordo como a principal categoria terapêutica comprovada. Como ansiolíticos simples temos a *Valeriana officinalis*, *Piper methysticum*, *Passiflora incarnata*, *Melissa officinalis* e *Matricaria recutita*,

enquanto que como antidepressivo tem-se apenas o *Hypericum perforatum*. Mesmo o Brasil apresentando uma grande biodiversidade, nenhuma das plantas registradas e comercializadas como ansiolítico ou antidepressivo é nativa (CARLO et al., 2001; CARVALHO et al., 2008; SARRIS, 2007).

**Tabela 4** – Projetos de pesquisa de produtos naturais em diferentes estágios de desenvolvimento, distribuídos conforme a categoria terapêutica

Área terapêutica	Pré-clínica	Fase I	Fase II	Fase III	Pré registro	Total
Câncer	34	15	26	9	2	86
Anti infecciosos	25	4	7	2	2	40
Neurofarmacológicos	6	3	9	4	0	22
Cardiovascular/gaстрintestinal	9	0	5	6	0	20
Inflamação	6	2	9	1	0	18
Metabolismo	7	3	6	1	0	17
Pele	7	1	2	0	0	10
Hormônio	3	0	2	1	0	6
Imunossupressor	2	2	0	2	0	6
<b>Total</b>	<b>99</b>	<b>30</b>	<b>66</b>	<b>26</b>	<b>4</b>	<b>225</b>

Fonte: Harvey (2008)

No entanto, além dos estudos de eficácia realizados, é necessário comprovar a segurança da utilização deste composto na clínica, antes de ser utilizados em pacientes no tratamento de distúrbios psiquiátricos, ademais do controle de qualidade dos possíveis produtos. Independente da patologia é de grande importância o estudo sobre compostos ativos presentes em plantas, sua relação com a atividade farmacológica exercida, além de sua toxicidade. Considerando a dificuldade do paciente à adesão terapêutica de métodos convencionais, devido aos efeitos colaterais que ocorrem principalmente em tratamentos de longa duração, medicamentos derivados de plantas medicinais podem fornecer uma alternativa para os pacientes que apresentam condições persistentes e intolerância aos efeitos adversos, já tendo sido demonstrado os efeitos benéficos de plantas e seus constituintes em estudos clínicos destes no tratamento de distúrbios psiquiátricos, como a ansiedade e depressão (SARRIS, 2007; ZHANG, 2004).

### Estudo etnobotânico e a seleção de espécie vegetal para o estudo

Para selecionar a espécie vegetal que foi utilizada no presente estudo, baseou-se em um estudo etnobotânico realizado por Bolson (2009). Dentre as espécies vegetais, destacamos as que apresentaram relatos de indicação popular relacionados com um possível efeito central e restritas informações na literatura científica.

Em março de 2010, realizou-se a coleta das folhas das espécies vegetais selecionadas (Tabela 5), nos municípios de Foz do Iguaçu (Refúgio Biológico) e Vera Cruz do Oeste (Linha Jacutinga), estado do Paraná, nos mesmos locais onde elas haviam sido identificadas anteriormente por Bolson (2009).

**Tabela 5** – Espécies vegetais e seu uso popular (relacionado ao SNC) conforme pesquisa etnobotânica nos municípios de Foz do Iguaçu e Vera Cruz do Oeste, Paraná.

NOME CIENTÍFICO		NOME POPULAR	USO POPULAR
<i>Tynanthus micranthus</i>	Miers	Cipó-cravo	Calmante Analgésico Dor de cabeça
<i>Passiflora amethystina</i>	J.C. Mikan	Maracujá	Controla pressão alta Calmante
<i>Dioclea violacea</i>	Mart. Ex Benth.	Olho-de-boi	Evita sequelas e recupera movimentos causados por derrames
<i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers		Cipó-são-joão	Depressão
<i>Patagonula americana</i>	L.	Guajuvira	Tensão nervosa
<i>Leandra</i> sp.		Pixirica	Memória

Fonte: Bolson (2009).

Dentre as seis plantas de interesse, a *Tynanthus micranthus* foi a que apresentou maior quantidade de material vegetal que conseguimos coletar. Sendo assim, decidiu-se avaliar se esta espécie apresenta possível atividade ansiolítica e antidepressiva em modelos comportamentais.

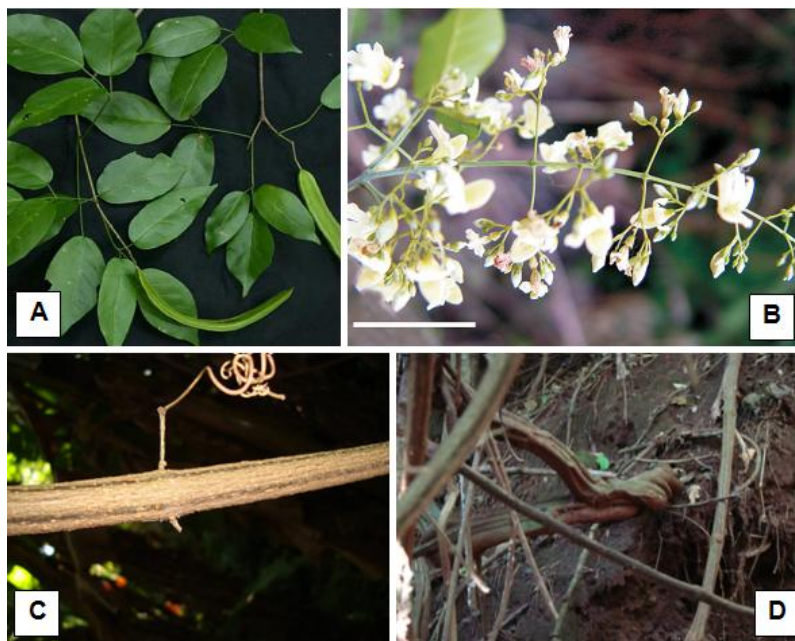
### ***Tynanthus micranthus* – Aspectos morfológicos, uso popular, atividade biológica e fitoquímica**

A família *Bignoniaceae*, que compreende um grande número de espécies com hábito lianescente, possui sete tribos, cerca de 100 gêneros e 860 espécies, com distribuição ampla nas regiões tropicais e subtropicais, apresentando maior diversidade no norte da América do Sul. No Brasil ocorrem 55 gêneros e 316 espécies, sendo que *Bignoniaceae* apresenta 45 gêneros e 269 espécies (cerca de 74% da tribo) registradas no Brasil (SOUZA; SANTOS; MOSCHETA, 2010).

A família *Bignoniaceae* destaca-se entre as famílias botânicas onde os metabólitos secundários são de ocorrência comum, como por exemplo, glicosídeos iridóides e alcalóides iridóides, naftoquinonas e antraquinonas, complexos ésteres e glicosídeos de 0-difenólico, taninos, flavonóides, antocianinas e carotenóides (GENTRY, 1980).

Dentre as plantas pertencentes a esta família, está a *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo ex K. Schum. Ela é popularmente conhecida como cipó-cravo, devido ao forte odor de cravo que exala dos caules, quando cortados ou macerados, e é facilmente encontrada em remanescentes florestais na região Noroeste do Paraná, Brasil (CANSIAN, 2010; LOPES et al., 2008; (SOUZA; SANTOS; MOSCHETA, 2010).

O *Tynanthus micranthus*, assim como as demais lianas, trata-se que uma trepadeira, apresentando gavinha simples, caule cilíndrico, folíolos com base simétrica, pecíolo maior que 2,5 cm e completamente glabro, limbo com tricomas apenas domácias. Seu fruto é uma cápsula linear achatada tetrágona, com valvas paralelas ao septo com suas margens levantadas ou aladas e irregularmente rugosas ou despedaçada quando madura e suas superfícies quase lisas com a nervura central, ou apresentando saliências (Figura 7). As sementes são transversalmente oblongas com asas hialinas, membranáceas e largas (CANSIAN, 2010; SOUZA; SANTOS; MOSCHETA, 2010; UDULUTSCH, 2004).



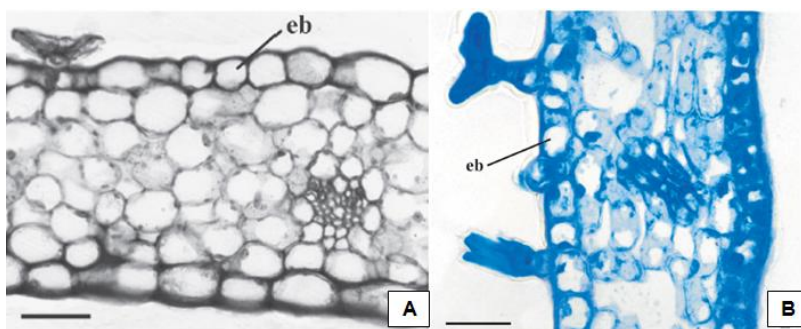
**Figura 7** – Imagens da planta *Tynanthus micranthus* Corr. Méllö ex K. Schum. Em (A) folhas e frutos; (B) inflorescências; (C) ramos com gavinha e (D) Caule e ramos. Em (B), barra = 2 cm. Fonte: Udulutsch (2004) e Souza; Santos e Moscheta (2010) (A e B respectivamente).

*Tynanthus micranthus* Corr. Méllö ex K. Schum caracteriza-se por apresentar inflorescência do tipo tirso ou panícula, diclamídeas, heteroclamídeas, gamossépalas, gamopétalas, monoclinas, hipóginas, nectaríferas, unipistiladas, e possuem androceu com um estaminódio e quatro estames providos de anteras rimosas e divergentes. O cálice tem coloração branca e a corola é bilabiada. Anatomicamente, as sépalas são unisseriadas, tricomas e estomatíferas, possuindo tricomas peltados. O mesofilo é homogêneo e esponjoso, e suas células apresentam lobos menos pronunciados, com espaços intercelulares mais reduzidos (SOUZA; SANTOS; MOSCHETA, 2010).

A corola apresenta epiderme unisseriada, tricomatosa e mesofilo homogêneo esponjoso. Os tricomas são tectores, glandulares e peltados (escamas). Os tricomas glandulares têm pedicelo, que pode ser curto ou longo, com células amplas ou estreitas, e ápice secretor com células mais ou menos arredondadas ou alongadas radialmente (SOUZA; SANTOS; MOSCHETA, 2010).



A estrutura de sépalas e pétalas é caracterizada por sistema vascular pobremente desenvolvido, ausência de esclerênquima nas nervuras e mesofilo homogêneo, conforme observado na Figura 8. Os filetes possuem epiderme unisseriada e com raros tricomas. No filete há também parênquima e apenas um feixe vascular anficrival ou hemi-anficrival. As anteras são tetrasporangiadadas. A antera jovem apresenta a parede constituída de epiderme, endotécio, uma camada mediana e tapete secretor. De acordo com os padrões de formação da parede da antera, as anteras de *Tynanthus micranthus* podem ser do tipo dicotiledôneo. O tapete glandular ocorre em todo saco polínico, podendo ser externo (parede da antera) e interno (região do conectivo). As células do tapete são binucleadas. A variação do número de núcleos das células do tapete pode estar associada ao período de desenvolvimento da antera e às fusões nucleares que podem ocorrer em células do tapete (SOUZA; SANTOS; MOSCHETA, 2010).



**Figura 8** – Estruturas da (A) sépala e (B) pétalas (limbo em seção transversal) de *Tynanthus micranthus*. eb = epiderme da face abaxial. Barra = 50  $\mu$ m. Fonte: Souza; Santos e Moscheta (2010).

O estilete tem contorno elipsóide e é oco com uma pequena fenda. O estilete possui epiderme unisseriada, com tricomas tectores, parênquima, dois feixes vasculares colaterais e tecido transmissor. Esse tecido é formado pela epiderme secretora, que pode apresentar apêndices celulares semelhantes a tricomas. O estigma é bipartido, apresentando tecido secretor, receptivo ao pólen, na face adaxial (SOUZA; SANTOS; MOSCHETA, 2010).

O ovário é bicarpelar e possui epiderme unisseriada, estomatífera, com células que variam de cuboides a tabulares ou curtamente prismáticas, e com tricomas tectores simples e pluricelulares. O mesofilo é parenquimático. No ovário, mesmo em pré-antese, desenvolve-se tecido

meristemático nos estratos celulares medianos do mesofilo, que sofre divisões em vários planos. A epiderme interna é unisseriada e glabra. A vascularização de cada carpelo do ovário é feita por um feixe dorsal, vários feixes laterais e um feixe ventral, todos colaterais. Entretanto, um dos feixes colaterais, localizado paralelamente ao septo, apresenta maior calibre. O septo é constituído por epiderme unisseriada, tecido parenquimático e, neste último, ocorrem os feixes ventrais dos dois carpelos. Na epiderme do septo, na região da placentação, as células podem se apresentar mais alongadas radialmente e tricomas pluricelulares nessa região. As células mais alongadas e os tricomas, observados em *Tynanthus micranthus*, podem funcionar como obturador que é considerado como uma estrutura especial, localizada nas proximidades da micrópila do óvulo, de origem funicular e/ou placentária, que serve como guia para o crescimento do tubo polínico. Esta estrutura pode ser proeminente, formada por tricomas secretores ou simplesmente uma região da epiderme papilosa (SOUZA; SANTOS; MOSCHETA, 2010).

Os óvulos são anátropos, unitegumentados, tenuinucelados e com hipóstase. As espécies apresentam nectário que se dispõe sob forma de anel ao redor do ovário. Esse nectário consiste de epiderme, parênquima secretor e apenas floema como tecido vascular (SOUZA; SANTOS; MOSCHETA, 2010).

A distribuição geográfica das plantas do gênero *Tynanthus*, no Brasil, é variada, conforme observado na Figura 9 (A). Essas plantas podem ser encontradas no Norte (Pará, Amazonas, Acre, Rondônia), Nordeste (Maranhão, Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul).

Porém, cada espécie apresenta uma particularidade quanto à distribuição geográfica. Um exemplo disso, é a distribuição da espécie *Tynanthus fasciculatus* que predomina na região Sudeste, nos estados de Minas Gerais e São Paulo (Figura 9 - B), enquanto que a da espécie *Tynanthus panurensis*, encontra-se distribuída na região Norte, estados de Pará e Amazonas (Figura 9 - C).



**Figura 9** – Mapa demonstrando a distribuição geográfica no Brasil das plantas do (A) gênero *Tynanthus* e das espécies (B) *Tynanthus fasciculatus* e (C) *Tynanthus panurensis*. Fonte: Lohmann (2010).

A espécie *Tynanthus micranthus* encontra-se distribuída, no Brasil, nas regiões do Centro-Oeste, Sudeste e Sul, nos estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná. Ela também pode ser encontrada em porções da Argentina, próximas à divisa com o Brasil (Figura 10).



**Figura 10** – Mapa demonstrando a distribuição geográfica da espécie *Tynanthus micranthus* no (A) Brasil e na (B) América do Sul. Fonte: Lohmann (2010) e Medeiros (2010).

As espécies do gênero *Tynanthus* são utilizadas popularmente para diversas finalidades medicinais, e poucas foram amplamente estudadas cientificamente. As espécies *Tynanthus fasciculatus* Miers e *Tynanthus elegantus* Miers são utilizadas como afrodisíaco, carminativo, estimulante, tônico, para problemas estomacais e para dispepsia (BRANDÃO et al., 2009). Já a *Tynanthus micranthus* é utilizada popular como estimulante e afrodisíaca (CANSIAN, 2010), porém na região Oeste do Paraná, esta planta é utilizada pela população como calmante e analgésica (BOLSON, 2009).

No mercado farmacêutico são encontrados para comercialização alguns produtos contendo planta do gênero *Tynanthus* (Figura 11). Um produto encontrado é o Sexotone, composto por uma associação de plantas (*Anemopaegma mirandum* Candolle, *Paulinia cupana* Kunth, *Tynanthus fasciculatus* Miers, *Ptychopetalum olacoides* Benthams). Segundo o laboratório, Sexotone é indicado nos casos de impotência sexual funcional, estimulante e afrodisíaco feminino e masculino, além de ser um revigorante energético, tônico e estimulante do sistema nervoso central (SNC) (BELEM JARDIM, 2011). O outro produto é o Clavo Huasca, uma tintura da planta *Tynanthus panurensis*, sendo utilizado como afrodisíaco, analgésico, estimulante digestivo, antipirético e estimulante (RAINTREE NUTRITION, 2011).



**Figura 11** – Produtos comercializados contendo planta do gênero *Tynanthus*. Em (A), uma tintura composta pela planta *Tynanthus panurensis*, e em (B) cápsulas contendo associação de plantas, incluindo a planta *Tynanthus fasciculatus*.

Quanto aos estudos científicos, trabalho realizado por Plaza e colaboradores (2005), demonstrou que o composto verbascosideo, encontrado na planta *Tynanthus panurensis* possui uma interessante atividade analgésica e um efeito de proteção contra a redução de comportamentos sexuais e de aprendizagem em camundongos, o que pode servir de evidência para o seu uso popular como afrodisíaco. Essa atividade relatada por esses autores pode ser explicado pela capacidade de redução de radicais que o verbascosideo apresenta (SHI et al., 2011).

Cansian (2010) demonstrou fraca atividade antimicrobiana de diferentes extratos da planta *Tynanthus micranthus* contra *E. coli* (extrato bruto da raiz e caule), *S. aureus* e *P. aeruginosa* (extrato bruto do caule e folha), todas com concentração mínima de 1000µg/mL. Para a atividade antioxidante, a fração que melhor apresentou resultado no teste de redução do complexo fosfomolibdênio foi a fração clorofórmio folha,

sendo similar à rotina. Na avaliação frente à enzima tirosinase, a fração hidroalcoólica folha apresentou atividade ao estimular a tirosinase na concentração de 100µg/mL. Devido ao resultado apresentado para esta avaliação, a autora sugere a utilização desta planta no tratamento de doenças de hipopigmentação. No teste de toxicidade frente à *Artemia salina*, as frações de acetato de etila da raiz, caule e folha, fração clorofórmico caule e folha apresentaram relativa toxicidade, com valor de DL<sub>50</sub> inferior a 1000µg/mL, igual ao sulfato de quinidina, utilizado como controle positivo (CANSIAN, 2010).

Em trabalho realizado por Cansian (2010), foi investigada a presença de determinadas classes fitoquímicas em diferentes extratos e partes da planta *Tynanthus micranthus*. Foi evidenciada a presença de flavonóides (flavonas, diidroflavonóis e leucoantocianidinas), esteróides e/ou triterpenos e heterosídeos antraquinônicos. Foram isolados alguns compostos, entre eles um hidrocarboneto de cadeia longa, com estrutura não completamente elucidada, a flavona apigenina, pela primeira vez isolada neste gênero e o esteróide β-sitosterol.

No óleo volátil extraído das folhas de *Tynanthus micranthus*, a mesma autora identificou os seguintes compostos: O-decil-hidroxilamina, hexadecametil-ciclooctasiloxane, éster butil, éster com butil glicolato, metilhexadecanoato, Ácido 1,2 benzenodicarboxílico, butil 2-etilexil éster, ácido hexadecanóico (ácido palmítico), pentadecanal, ciclodecasiloxane, eicosametil, 5-dodeciloxolan-2-ona e ácido oléico.

Devido à falta de estudos comprovando a sua atividade farmacológica, e por indicar um possível efeito relacionado ao Sistema Nervoso Central, devido ao seu uso popular, mesmo que contraditório (calmante e estimulante), despertou-se o interesse em realizar estudos mais avançados para verificar seus possíveis efeitos ansiolíticos e antidepressivos, usando-se modelos validados de avaliação comportamental em camundongos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar se a planta *Tynanthus micranthus* apresenta possível atividade ansiolítica e/ou antidepressiva, em experimentos comportamentais. Além disso, avaliar a viabilidade da realização destes por uma indústria farmacêutica nacional como critério de investigação de plantas promissoras para novos produtos nesta área terapêutica.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter extrato bruto das folhas de *Tynanthus micranthus*, coletadas na região do Oeste do Paraná;
- Realizar análises de fitoquímica preliminar para investigar a presença de determinadas classes fitoquímicas presentes nas folhas de *Tynanthus micranthus*;
- Avaliar a atividade ansiolítica e antidepressiva, por meio de testes comportamentais, do extrato bruto seco de folhas de *Tynanthus micranthus*, administrado por via oral em camundongos Swiss;
- Avaliar a atividade hipnosedativa e anticonvulsionante, por meio de testes comportamentais complementares, em caso de um possível efeito ansiolítico do tipo benzodiazepínico, do extrato seco de folhas de *Tynanthus micranthus*, administrado por via oral em camundongos Swiss;
- Avaliar a atividade motora do extrato bruto seco, por meio de testes comportamentais complementares, do extrato seco de folhas de *Tynanthus micranthus*, administrado por via oral em camundongos Swiss;
- Avaliar o custo financeiro das atividades realizadas com uma espécie vegetal, desde a etapa de coleta até a avaliação da atividade farmacológica, verificando se a aplicação de modelos comportamentais pode contribuir para a descoberta de plantas promissoras para as atividades ansiolíticas e antidepressivas;

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção do material vegetal**

As folhas de *Tynanthus micranthus* Corr. Méllö ex K. Schum foram coletadas em uma propriedade particular localizada na Linha Jacutinga, município de Vera Cruz do Oeste, Paraná, Brasil, em março de 2010. A coleta foi realizada entre as 9 e 10 horas da manhã.

Foi feito uma exsicata contendo os ramos e folhas da espécie vegetal (planta estéril). A mesma foi entregue ao Herbário da Universidade Federal do Paraná. O material vegetal (planta estéril) foi previamente identificado por uma especialista em plantas da família Bignoniaceae, como sendo da espécie *Tynanthus micranthus* Corr. Méllö ex K. Schum.

Durante a próxima floração (setembro a dezembro de 2011), será coletado um novo ramo com as flores, para que possam ser depositados em um herbário e permitir a correta identificação deste material vegetal.

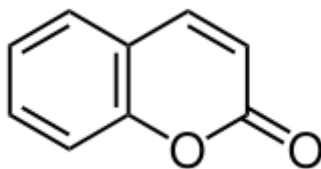
Foram selecionadas as folhas íntegras da espécie *T. micranthus*, sendo estas secas à temperatura ambiente por 30 dias. Em seguida, o material foi armazenado à temperatura ambiente, em recipiente fechado e identificado, até o momento de sua utilização.

#### **3.2 Análise fitoquímica preliminar**

No presente trabalho, as classes fitoquímicas pesquisadas nas folhas da planta *Tynanthus micranthus* foram cumarinas voláteis, polifenóis (taninos, catequinas, flavonóides, heterosídeos antociânicos e antraquinonas), alcalóides, metilxantinas e saponinas, conforme descrito abaixo:

##### **3.2.1 Análise fitoquímica de cumarinas voláteis:**

Estruturalmente, as cumarinas são lactonas do ácido o-hidróxicinâmico (2H-1-benzopirano-2-onas), sendo o seu representante mais simples a cumarina (1,2-benzopirona). Na Figura 12 é possível visualizar a estrutura básica da cumarina.

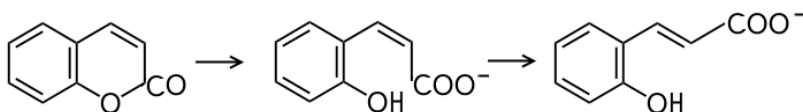


**Figura 12** – Estrutura básica das cumarinas.

Fonte: Simões et al. (2007)

As cumarinas são caracterizadas pela observação sob luz ultravioleta (360 nm), pois a maioria possui fluorescência azul brilhante ou verde. As cumarinas em solução alcalina desenvolvem cor amarela, devido ao rompimento do anel lactônico. Essa reação é revertida pela adição de uma solução ácida.

A pesquisa baseia-se na conversão em sal alcalino fluorescente do ácido hidroxi cinâmico, por meio da dissolução das cumarinas em álcali cáustico com clivagem do anel pirrólico e conseqüente formação do ácido hidroxi cinâmico ou sais de seu ânion. Ao irradiar luz ultravioleta, a forma *cis* migra para forma *trans* (Figura 13), que exibe coloração azul ou verde amarelada em poucos minutos (COSTA, 2000; SIMÕES et al., 2007).



**Figura 13** – Formação do ácido *cis*-o-hidroxicinâmico e *trans*-o-hidroxicinâmico a partir da dissolução da cumarina em meio alcalino. A forma *trans* desse ácido exibe fluorescência, indicando a presença de cumarinas em reações de fitoquímica preliminar. Fonte: Costa (2000).

*Procedimento experimental:* Em um tubo de ensaio, pesou-se 1 g da planta, previamente triturada. O mesmo foi coberto com papel filtro umedecido com uma solução de hidróxido de sódio a 5% (p/v). Aqueceu-se o tubo de ensaio em banho-maria fervente por 5 min. Retirou-se o papel filtro e o mesmo foi observado em luz ultravioleta, observando-se a coloração formada.



O aparecimento de coloração azul ou verde amarelada indica a presença de cumarinas voláteis (COSTA, 2000; SIMÕES et al., 2007).

### 3.2.2 Análise fitoquímica de polifenóis:

Os polifenóis são substâncias redutoras, oxidando-se com facilidade e resultando em substâncias coradas. A cor desses produtos de oxidação deve-se ao elevado grau de conjugação. Oxidantes como cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), são empregados para a caracterização de polifenóis em geral. Neste caso, considera-se positivo quando é observada a coloração azul ou verde-azulada. Para melhor caracterizar a classe específica a que pertencem, passa-se a realizar reações particulares para cada grupo.

*Procedimento experimental:* Preparou-se uma solução extrativa com 2 g da planta previamente triturada e 100 mL de água destilada, deixando-a sob fervura por 5 min, e em seguida filtrada. Realizaram-se as reações abaixo:

- *Reação de precipitação com cloreto férrico:*

Separou-se dois tubos de ensaio, um para a solução extrativa e o outro para o controle positivo. Em um dos tubos, adicionou-se 1 mL de solução extrativa, 10 mL de água deionizada e uma gota de cloreto férrico a 1% (p/v), homogeneizando lentamente.

A formação de precipitado é indicativa da presença de compostos fenólicos.

- *Reação de precipitação com acetato de chumbo:*

Separou-se dois tubos de ensaio, um para a solução extrativa e o outro para o controle positivo. Em um dos tubos, adicionou-se 5 mL de solução extrativa e 10 mL de uma solução de ácido acético a 10% e 5 mL de uma solução de acetato de chumbo a 10%.

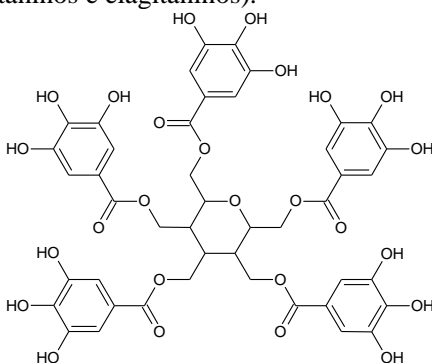
Esta é uma reação geral para compostos fenólicos. A formação de precipitado é indicativa da presença de compostos fenólicos.

#### 3.2.2.1 Análise fitoquímica de taninos

Os taninos são classificados em dois grupos segundo a sua estrutura química, sendo os taninos hidrolisáveis e os taninos condensados.

Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente  $\beta$ -D-glicose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico. O composto  $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagalactil-D-glicose (Fi-

gura 14) representa o padrão máximo de substituição alcançado, sendo considerado o precursor imediato para ambas as classes de taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos).



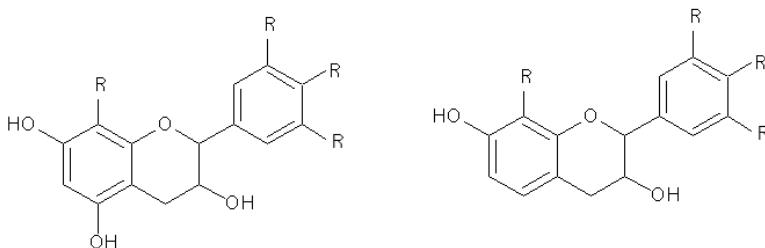
**Figura 14** – Composto  $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagaloi-D-glicose, representando o padrão máximo de substituição alcançado nos taninos hidrolisáveis, originando os galotaninos e os elagitaninos.

Fonte: Simões et al. (2007).

Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela poli-condensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Essa classe de taninos é chamada também de proantocianidina, devido ao fato de os taninos condensados produzirem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, tais como cianidina e delphinidina, após degradação com ácido mineral diluído à quente.

Os taninos condensados podem ser divididos em dois tipos face à presença ou ausência de hidroxila na posição C-5 do anel A, conforme visualizado na Figura 15.

Os taninos de modo geral podem ser caracterizados por reações de coloração ou de precipitação. As reações comumente utilizadas são de precipitação com gelatina ou pó de pele, sais de alcalóides e metais pesados. Taninos hidrolisáveis e condensados podem ser diferenciados através da reação de Stiasny (HCl concentrado e formol), ocorrendo precipitação destes últimos. No sobrenadante, pode-se detectar a presença de taninos hidrolisáveis através da reação de cloreto férrico, desenvolvendo coloração azul (SIMÕES et al., 2007).



**Figura 15** – Monômeros básicos de taninos condensados. Cada monômero será precursor de tipos diferentes de taninos condensados, variando as substituições realizadas nas ligações indicadas por “R”.

Fonte: Simões et al. (2007).

*Procedimento experimental:* Preparou-se uma solução extrativa com 2 g da planta previamente triturada e 100 mL de água destilada, deixando-a sob fervura por 5 min, e em seguida filtrada. Realizaram-se as reações abaixo:

- *Reação de precipitação com gelatina:*

Separou-se dois tubos de ensaio, um para a solução extrativa e o outro para o controle positivo. Em um dos tubos, adicionou-se 1 mL de solução extrativa e uma gota de ácido clorídrico a 20% (v/v). Adicionou-se gota-a-gota a solução de gelatina a 25% (p/v).

A formação de precipitado é indicativo da presença de taninos.

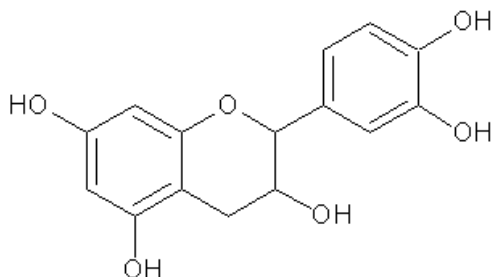
- *Reação de precipitação com alcalóides:*

Separou-se dois tubos de ensaio, um para a solução extrativa e o outro para o controle positivo. Em um dos tubos, adicionou-se 1 mL de solução extrativa e uma gota de ácido clorídrico a 20% (v/v). Adicionou-se 2 gotas de uma solução de sal de alcalóides a 0,1% (p/v) (atropina).

A formação de precipitado é indicativa da presença de taninos.

### 3.2.2.2 **Análise fitoquímica de catequinas:**

As catequinas são classificadas como sendo taninos condensados. As mesmas são sintetizadas a partir das leucoantocianidinas para, posteriormente, sofrerem redução na posição C-4 (Figura 16). Essa reação é catalisada pela flavan-3,4-*cis*-diol-redutase (SIMÕES et al., 2007).



**Figura 16** – Estrutura básica das catequinas, sintetizadas a partir das leucoantocianidinas.

Fonte: Simões et al. (2007)

Catequinas são compostos cristalinos, ligeiramente solúveis na água fria e no éter e insolúveis no clorofórmio e benzeno. Coram-se de verde pelo cloreto de ferro, porém não são observadas outras propriedades dos taninos (como a reação com pó de pele).

Quanto as reações de caracterização de catequinas, encontra-se na literatura diversas reações de coloração, como a reação do floroglucinol, com cloreto de ferro e com vanilal, porém a maioria não são específicas para a classe de catequinas.

*Procedimento experimental:* Preparou-se uma solução extrativa com 1 g da planta, previamente triturada, e 100 mL de uma solução etanólica a 70% (v/v). Deixou-se em agitação por 3 h. Filtrou-se em seguida. Um palito de madeira foi embebido na solução extrativa por 3 h. Evaporou-se o solvente até a quase secura do palito. Em seguida, foi umedecido uma das extremidades do palito com ácido clorídrico concentrado. Secou-se o palito ao calor de uma chama forte, evitando a sua carbonização.

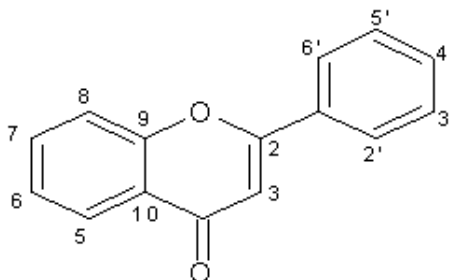
O aparecimento de coloração vermelha ou pardo-avermelhado indica a presença de catequinas.

### 3.2.2.3 Análise fitoquímica de flavonóides:

Os flavonóides são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides. Eles constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos em plantas, responsáveis por diversas funções, como proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além da proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização;

antioxidantes; controle da ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (SIMÕES et al., 2007).

Podem ser encontradas diversas formas estruturais de flavonóides. Entretanto, a maioria dos representantes desta classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas, conforme ilustrado na Figura 17 (SIMÕES et al., 2007).

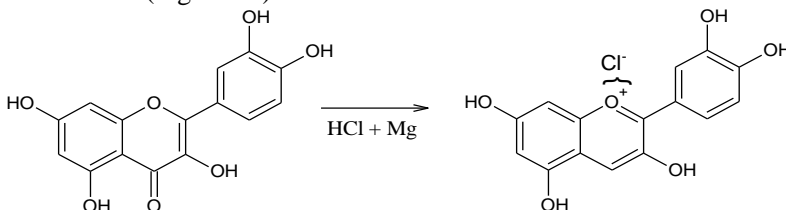


**Figura 17** – Estrutura básica dos flavonóides.

Fonte: Simões et al. (2007).

Para a caracterização de flavonóides, podem ser utilizadas diversas reações, sendo que uma complementa a outra. A reação da cianidina ou Shinoda (HCl concentrado e magnésio em pó) é o mais comumente utilizado, uma vez que é característico para a maioria das substâncias desta classe que apresentam núcleo  $\alpha$ -benzopirona, produzindo coloração laranja. Esse teste apresenta uma limitação, pois chalconas e isoflavonas não produzem coloração.

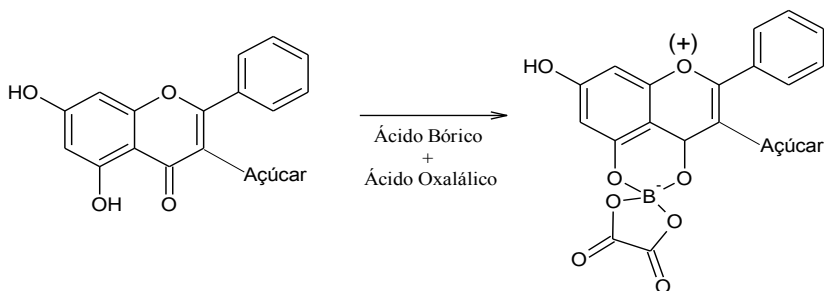
A redução efetua-se, em geral, pelo hidrogênio. O composto, como por exemplo quercetol, reage na presença de HCl concentrado e magnésio em pó, sendo reduzido a cianidina, resultando em coloração característica (Figura 18).



**Figura 18** – Reação da Cianidina como método para indicar a presença de flavonóides.

Fonte: Costa (2000).

A reação de oxalo-bórica é particular de flavonóis, resultando em fluorescência amarela-esverdeada. As flavonas, flavanonas e isoflavonas não produzem fluorescência. Nesta reação tem-se a formação de derivados do ácido borínico (compostos obtidos do ácido bórico por substituição na sua molécula por dois radicais orgânicos), conforme ilustrado na Figura 19.



**Figura 19** – Reação de Oxalo-bórica como método para indicar a presença de flavonóides do tipo flavonóis.

Fonte: Costa (2000).

Além das reações citadas acima, tem-se também a realização de reações com o cloreto de antimônio, com hidróxidos alcalinos, com cloreto férrico e com cloreto de alumínio, cada qual com suas particularidades (COSTA, 2000). Na Tabela 6 tem-se um resumo das colorações originadas em algumas reações cromáticas conforme o composto presente na amostra.

**Tabela 6** – Relação entre reações cromáticas e a coloração obtida conforme o tipo de flavonóide presente na amostra analisada

<b>Reação</b>	<b>Flavonas</b>	<b>Flavonois</b>	<b>Flavanonas</b>	<b>Chalconas</b>	<b>Isoflavanonas</b>
Cianidina	Laranja	Vermelha	Violeta	----	----
Oxalo-Bórica	----	Fluorescência Amarelo-verde	----	----	----
Cloreto de antimônio	Amarela	Amarela	Amarela	Vermelha ou violeta	Amarela
Hidróxido de sódio	Amarela	Amarelo-escura	Amarela	Amarela	Amarela
Cloreto Férrico	Verde	Verde-castanha	Verde- castanha-	Amarela	Verde
Cloreto de alumínio	Amarelo- verde	Amarela	Fluorescência azul-verde (UV)	Amarela	Amarelo- castanha

Fonte: Costa (2000).

*Procedimento experimental:* Preparou-se um extrato vegetal aquecendo em banho-maria 2 g de planta previamente triturada com 50 mL de álcool 70% por 10 min. Filtrou-se à quente. Separou-se o extrato para realizar os seguintes ensaios:

- *Reação de Cianidina/Shinoda:*

Adicionou-se 5 mL do extrato em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 100 mg de magnésio em fita (pequenos pedaços) e 1 mL de ácido clorídrico concentrado pelas paredes do tubo inclinado.

A formação de coloração avermelhada é indicativa da presença de flavonóides.

- *Reação de Oxalo-Bórica:*

Colocou-se 8 mL do extrato em uma cápsula de porcelana, levando a secura em banho-maria. Adicionou-se ao resíduo 3 mL de uma solução de ácido bórico a 3% (p/v) e 1 mL de ácido oxálico a 1% (p/v). Evaporou-se novamente até resíduo. Deixou-se esfriar. Na cápsula fria, dissolveu-se o resíduo com 10 mL de éter etílico. Transferiu-se a solução etérea através de pipeta de Pasteur, para um tubo de ensaio.

Verificou-se a presença de fluorescência na solução.

- *Reação com Hidróxido de Sódio:*

Colocou-se 5 mL do extrato em uma cápsula de porcelana, levando a secura em banho-maria. Deixou-se esfriar e adicionou-se 3 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 5% (p/v).

Na presença de Flavonóides a solução adquire coloração amarela.

- *Reação com Cloreto Férrico:*

Colocou-se 5 mL do extrato em uma cápsula de porcelana, levando a secura em banho-maria. Deixou-se esfriar e adicionaram-se algumas gotas de uma solução de cloreto férrico a 4,5% (p/v).

Observou-se a coloração obtida.

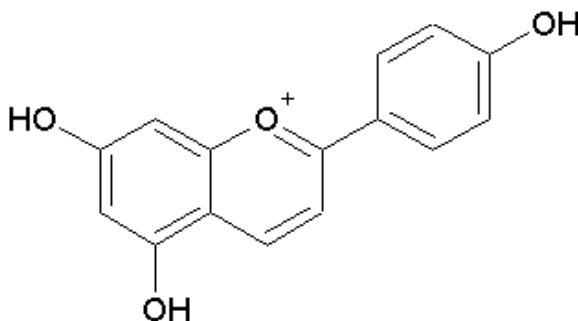
### **3.2.2.4 Análise fitoquímica de heterosídeos antociânicos:**

Heterosídeos são compostos resultantes da ligação covalente formada entre uma ou mais unidades de açúcar e outra estrutura diferente, chamada de aglicona. As antocianidinas (forma livre) são flavonóides que podem ser encontrados nas plantas na forma de heterosídeos, sendo



a sua forma mais estável. Esta forma é conhecida como heterosídeos antociânicos ou antocianosídeos (SIMÕES et al., 2007).

Pigmentos antocianosídeos são responsáveis pelas cores vermelho, azul e violeta das flores, frutos e também das cascas das plantas. Estes são muito solúveis em água e no álcool, porém são insolúveis no clorofórmio, éter ou benzeno. Por hidrólise, resultam em anticianóis ou antocianidinas (Figura 20) facilmente solúveis no álcool, porém muitas vezes insolúvel na água.



**Figura 20** – Cátion flavílio, núcleo fundamental dos antocianos.  
Fonte: Simões et al. (2007).

Os heterosídeos antociânicos, com sais de chumbo, formam precipitados insolúveis de cor azul-esverdeado, vermelho ou amarelo. Com a adição de ácido sulfúrico diluído, tem-se a decomposição da estrutura, regenerando os antocianósídeos.

A cor das soluções dos compostos antociânicos varia conforme os valores de pH: vermelho em meio ácido, violeta em meio próximo a neutralidade e azul em meio alcalino.

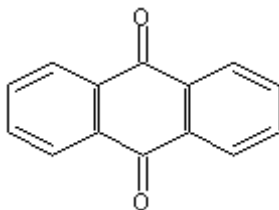
São poucas as técnicas para a caracterização de antocianóis e seus heterosídeos, pois a maioria se baseia pela solubilidade. Algumas técnicas se baseiam na decomposição das moléculas de heterosídeos antociânicos e identificação dos seus respectivos produtos. Isto pode ser obtido pela reação com ácido fórmico diluído.

*Procedimento experimental:* Preparou-se uma solução extrativa com 1 g de planta, previamente triturada, e 15 mL de solução de ácido fórmico a 5% (v/v), deixando sob agitação por 1 h. Em seguida, aqueceu-se a solução em banho-maria fervente por 5 min.

Na presença de compostos antociânicos observa-se, dentro de um curto espaço de tempo, a cor rosa ou vermelha.

### 3.2.2.5 Análise fitoquímica de antraquinonas:

As quinonas são compostos orgânicos que podem ser considerados como produto de oxidação de fenóis, podendo as quinonas serem reduzidas e originarem os fenóis. Sua principal característica é a presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas C-C. Em função do tipo de ciclo no qual o sistema de ligas duplas e cetonas conjugadas estão inseridos, têm-se três grupos principais de quinonas: naftoquinonas, antraquinonas e benzoquinonas. De modo geral, as antraquinonas apresentam o grupo p-quinona condensado em um grupo antraceno (Figura 21).



**Figura 21** – Estrutura básica de quinona do tipo antraquinona (9,10-antraquinona).

Fonte: Simões et al. (2007).

Como os derivados antraquinônicos ocorrem nos vegetais em vários níveis de oxidação, o material deve ser tratado para que ocorra a oxidação total destes até antraquinonas. Para isto, o material vegetal deve ser submetido ao aquecimento com mistura de KOH 0,5M e peróxido de hidrogênio diluído (reação de Borntræger). Pelo fato do meio dessa reação ser apolar, ela é direcionada para a detecção de compostos antraquinônicos livres através da solubilidade destes constituintes nos solventes orgânicos e na solubilidade dos respectivos fenatos alcalinos na água, em solução de amônia. Os derivados 1,8-di-hidroxi-antraquinonas coram-se de vermelho (COSTA, 2000; SIMÕES et al., 2007).

*Procedimento experimental:* Para a análise fitoquímica de antraquinonas, realizou-se o ensaio em 3 etapas:

- *Etapa 1:*

Em um tubo de ensaio adicionou-se 0,1 g de planta previamente triturada e 10 mL de uma solução de hidróxido de sódio 2 M. Ferveu-se em banho-maria por 2 min. Deixou-se resfriar, decantar e filtrou-se.

Considera-se positivo quando a solução apresenta coloração vermelha.

- *Etapa 2:*

Em um segundo tubo de ensaio, transferiu-se 5 mL da solução da Etapa 1, e adicionou-se 10 mL de uma solução de ácido clorídrico a 20% (v/v).

Considera-se positivo quando ocorrer a formação de um precipitado amarelo de compostos antraquinônicos.

- *Etapa 3:*

Notubo de ensaio da Etapa 1, adicionou-se 5 mL de tolueno, agitando-se lentamente. Decantou-se parte da solução toluênica corada de amarelo. Transferiu-se 2 mL desta para um terceiro tubo de ensaio, adicionando 2 mL de uma solução de hidróxido de amônio a 50% (v/v).

O aparecimento de coloração rosa ou vermelho-cereja na fase amoniacal - indica a presença de compostos antraquinônicos reduzidos - e a permanência de coloração amarela na fase toluênica indica a presença de antraquinonas livres.

### **3.2.3 Análise fitoquímica de alcalóides:**

Alcalóides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos, de estrutura química complexa, sendo difícil a separação entre alcalóides propriamente ditos e aminas complexas de ocorrência natural. Desta forma, classificam-se como alcalóides substâncias orgânicas, de origem natural, cíclica, contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é sob a forma de sais de ácidos orgânicos, solubilizados no suco celular, predominante em plantas angiospermas (COSTA, 2000; SIMÕES et al., 2007).

Os alcalóides são classificados conforme o local da estrutura na qual se encontra o átomo de nitrogênio. Muitos deles são opticamente ativos, e apresentam propriedades básicas, por isso, reagem com ácidos, resultando em sais, que são solúveis em água e insolúveis em solventes orgânicos habituais. Adicionando-se hidróxidos alcalinos em soluções aquosas destes sais, libertam-se os alcalóides, que podem precipitar de forma insolúvel (COSTA, 2000; SIMÕES et al., 2007).

As reações gerais para alcalóides baseiam-se na formação de complexos insolúveis (precipitados). Como resultados falso-positivos são bastante comuns para essas reações, previamente à análise o material a ser analisado deve ser submetido a extrações ácido/base. As reações gerais empregam os reagentes de Dragendorff (iodo-bismuto de potás-

sio), Mayer (iodo-mercurato de potássio), Wagner (iodo-iodeto de potássio) e Bertrand (ácido sílico-túngstico) (COSTA, 2000; SIMÕES et al., 2007).

*Procedimento experimental:* Preparou-se uma solução extrativa levando-se a fervura 2 g de planta previamente triturada, juntamente com 20 mL de ácido clorídrico a 10% (v/v). A mesma foi filtrada, e posteriormente alcalinizada com uma solução de hidróxido de amônio a 50% (pH 10). Transferiu-se a solução para um funil de separação e adicionou-se 10 mL de clorofórmio, agitando delicadamente e deixando em repouso. Separou-se a solução clorofórmica e repetiu-se este processo por mais 2 vezes. As soluções clorofórmicas foram juntadas e colocou-se 20 mL da solução extrativa em uma cápsula e evaporou-se o clorofórmio em banho-maria até a secura. Adicionou-se 15 mL de ácido clorídrico a 10% (v/v) e transferiu-se o líquido para tubos de ensaios numerados, prosseguindo conforme descrito abaixo:

- *Tubo 1:*

Adicionou-se 3 gotas do reagente de Dragendorff. Em caso de reação positiva para alcalóides, a solução se torna turva ou com precipitado;

- *Tubo 2:*

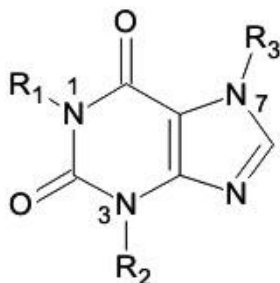
Adicionou-se 3 gotas do reagente de Mayer. Em caso de reação positiva para alcalóides, a solução se torna turva ou com precipitado;

- *Tubo 3:*

Adicionou-se 3 gotas do reagente de Bertrand. Em caso de reação positiva para alcalóides, a solução se torna turva ou com precipitado.

### **3.2.3.1 Análise fitoquímica de metilxantinas:**

As metilxantinas são constituintes químicos importantes de várias bebidas alimentícias ou estimulantes não alcoólicos, como café, chá-da-índia, guaraná, cola e chocolate, consumidos em todo o mundo, com grande importância econômica e cultural. As metilxantinas mais abundantes são a cafeína, teofilina e teobromina (Figura 22) (SIMÕES et al., 2007).



**Cafeína:** 1,3,7 trimetil xantina  
**Teobromina:** 3,7 dimetilxantina  
**Teofilina:** 1,3 dimetilxantina  
**Paraxantina:** 1,7 dimetilxantina  
 (metabólito ativo da cafeína)

**Figura 22** - Estrutura básica de metilxantina e as principais metilxantinas.

Fonte: Simões et al. (2007).

As metilxantinas são alcalóides, originadas de bases púricas (excluindo aminoácidos) e possuem caráter anfótero, pois podem se comportar como ácidos e bases. São compostos solúveis em água, em soluções aquosas ácidas à quente, etanol à quente, em solventes orgânicos clorados e em soluções alcalinas. Para soluções alcalinas é preferível a utilização de hidróxido de amônio, pois os hidróxidos alcalinos decompõem as metilxantinas com liberação de gás carbônico e amoníaco (SIMÕES et al., 2007).

Por se tratarem de alcalóides, as metilxantinas são extraídas do mesmo modo que os alcalóides. A reação de caracterização desta classe é conhecida como ensaio de murexido, que se baseia na oxidação das metilxantinas nos derivados metilados do ácido purpúrico, que apresentam coloração vermelha. Isto pode ser feito através de diversas técnicas, como por aquecimento com ácido azótico, por evaporação a temperatura moderada de água saturada de bromo ou cloro e por umas gotas de peróxido de hidrogênio ou de solução de clorato de potássio em meio acidulado pelo ácido clorídrico. Por adicionamento de amônia, forma-se o respectivo sal de amônio, conhecido por murexido, de coloração púrpura (COSTA, 2000).

*Procedimento experimental:* Preparou-se uma solução extrativa levando-se a fervura 2 g de planta previamente triturada, juntamente com 20 mL de ácido clorídrico a 10% (v/v). A mesma foi filtrada, e posteriormente alcalinizada com uma solução de hidróxido de amônio a 50% (pH 10). Transferiu-se a solução para um funil de separação e adicionou-se 10 mL de clorofórmio, agitando delicadamente e deixando em repouso. Separou-se a solução clorofórmica. Repetiu-se este processo por mais 2 vezes. Juntaram-se as soluções clorofórmica. Colocou-se 10

mL da solução extrativa em uma cápsula e evaporou-se o clorofórmio em banho-maria até a secura. Adicionou-se 5 gotas de uma solução de ácido clorídrico 6 M e 5 gotas de uma solução de peróxido de hidrogênio a 50% (v/v). Evaporou-se em banho-maria. Adicionaram-se ao resíduo da evaporação algumas gotas de hidróxido de amônio a 50% (v/v).

Na reação positiva para metilxantinas o líquido adquire coloração púrpura.

### 3.2.4 Análise fitoquímica de saponinas:

Saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Sua estrutura apresenta parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcar), proporcionando a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes e emulsificantes (SIMÕES et al., 2007).

As saponinas em solução aquosa formam espuma persistente e abundante. Essa atividade provém como nos outros detergentes, do fato de apresentarem na sua estrutura uma parte lipofílica (aglicona ou saponenina) e uma parte hidrofílica (um ou mais açúcares). A espuma é estável à ação de ácidos minerais diluídos, diferenciando-se dos sabões comuns (SIMÕES et al., 2007).

As saponinas podem ser classificadas de acordo com o núcleo fundamental da aglicona ou pelo seu caráter ácido, básico ou neutro (SIMÕES et al., 2007).

As reações para caracterização de saponinas são restritas, sendo normalmente associadas reações gerais para a detecção de triterpenos e esteróides. A reação de Liebermann-Burchard (anidrido acético-ácido sulfúrico concentrado) é empregada para a detecção de esteróides e triterpenos. Para a detecção de esteróides insaturados, também pode ser empregada a reação de Salkowsky (ácido sulfúrico concentrado). Para detectar saponinas emprega-se o teste de formação de espuma, sendo que esta deverá permanecer estável na presença de ácidos minerais diluídos.

*Procedimento experimental:* Para a avaliação de saponinas, realizou-se as reações descritas abaixo:

- *Reação de Liebermann-Buchard:*

Preparou-se uma solução extrativa com 1 g de planta, previamente triturada, e 50 mL de água deionizada, levando à fervura por 30 min. Deixou-se esfriar e filtrou-se. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico, completando o volume com água deionizada até 50 mL, homogeneizando em seguida. Transferiu-se 10 mL da solução ex-

trativa para uma cápsula de porcelana, evaporando o solvente em banho-maria até a secura. Depois de frio, adicionou-se na cápsula 1 mL de anidrido acético. Transferiu-se o conteúdo da cápsula para um tubo de ensaio. Adicionou-se ao tubo de ensaio 1 mL de ácido sulfúrico concentrado pelas paredes do tubo, sem agitar.

A presença de coloração azul ou verde é indicativa da presença de núcleo esteroidal. Coloração vermelha, rosa, púrpura ou violeta é indicativa de núcleo terpênico.

- *Reação de Salkowski:*

Preparou-se uma solução extrativa com 1 g de planta, previamente triturada, e 50 mL de água deionizada, levando à fervura por 30 min. Deixou-se esfriar e filtrou-se. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico, completando o volume com água deionizada até 50 mL, homogeneizando em seguida. Transferiu-se 10 mL da solução extrativa para uma cápsula de porcelana, evaporando o solvente em banho-maria até a secura. Depois de frio, adicionou-se 1 mL ácido sulfúrico concentrado.

O aparecimento de coloração castanho-escuro-avermelhado indica a presença de núcleo esteroidal.

- *Presença e permanência de espuma:*

Preparou-se uma solução extrativa com 1 g de planta, previamente triturada, e 100 mL de água deionizada, levando a fervura por 30 min. Durante a fervura, adicionou-se gota-a-gota de uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 10% (p/v), para neutralizar a solução. Deixou-se resfriar a solução. Em seguida, filtrou-se e transferiu-se a mesma para um balão volumétrico, completando o volume com água deionizada para 100 mL. Homogeneizou-se. Separou-se e numerou-se 10 tubos de ensaio idênticos (de 1 a 10). Adicionou-se solução extrativa e água nos mesmos, obtendo-se um volume total de 10 mL para cada tubo, conforme representado na Tabela 7. Agitou-se cada tubo durante 15 segundos com a mesma frequência. Deixou-se em repouso por 15 min. Após o repouso, anotaram-se as alturas das espumas para cada tubo. Adicionou-se 1 mL de uma solução de ácido clorídrico a 20% (v/v) e observou-se a permanência da espuma. Anotaram-se as alturas das espumas para cada tubo após a adição do ácido.

A presença de espuma, mesmo com a presença de ácido mineral diluída indica a presença de saponinas.

**Tabela 7** – Diluição das soluções extrativas, representando a quantidade em mL de solução extrativa e água, por tubo de ensaio, para a realização do teste de permanência de espuma como indicativo para a presença de saponinas

<b>Tubos de ensaio</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
Vol. da sol. Extrativa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume de água	9	8	7	6	5	4	3	2	1	-
<u>Volume Total</u>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

### 3.3 Obtenção do extrato aquoso bruto

O extrato aquoso bruto das folhas de *Tynanthus micranthus* foi preparado utilizando-se folhas secas da planta, previamente triturada, e água destilada (7% p/p) pelo método de infusão, sendo filtrado em seguida e armazenado em recipiente adequado em freezer à -20 °C, por 14 dias. Com o extrato congelado, o mesmo foi liofilizado utilizando Liofilizador marca Terroni, modelo LS6000 D, obtendo-se no final do processo o extrato bruto seco. O mesmo foi armazenado em freezer à -20 °C, até o momento da sua utilização.

#### 3.3.1 Rendimento do extrato aquoso bruto

Foi preparado o extrato aquoso bruto das folhas de *Tynanthus micranthus* conforme técnica descrita anteriormente. Anotou-se o volume final obtido. Transferiu-se 10 mL do extrato aquoso para cápsula de porcelana nº 80, previamente seco e pesado. Em seguida, deixou-se em banho-maria até secura. Transferiu-se a cápsula de porcelana para desidsecador, deixando em repouso até resfriar. Pesou-se a cápsula de porcelana e calculou-se o rendimento do extrato, sendo o resultado expresso em porcentagem. O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.4 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, com idade entre 3 e 4 meses (35 a 50 g). Os animais foram alojados em grupos de no máximo 20 por caixa e mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ); ciclo claro/escuro 12/12 h, com luzes se acendendo às 07:00; e acesso à água e ração *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Sobre o Uso de Animais da Uni-



versidade Federal de Santa Catarina (23080.040914/2010-46/CEUA/UFSC, PP00415), conforme apresentado no Anexo I.

Após a realização dos experimentos, os animais foram encaminhados para o Biotério setorial do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde um técnico especializado realizou o sacrifício dos mesmos em câmara de gás carbônico.

### 3.5 Aspectos gerais

Foram realizados testes de triagem hipocrática e para a avaliação das atividades ansiolítica, antidepressiva e analgésica, conforme apresentados no fluxograma geral (Tabela 8).

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais: controle positivo (droga padrão conforme procedimento experimental), controle (água destilada) e tratado 100 mg/Kg, 300 mg/kg e 600 mg/kg (extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *Tynanthus micranthus*). O extrato aquoso bruto foi dissolvido em água destilada minutos antes de ser administrado.

O tratamento foi realizado por via oral, através de cânulas de gavagem (0,1 mL/ 10g). Os animais foram testados individualmente, 1 h após o tratamento por via oral, tempo necessário para ação terapêutica para a maioria das drogas quando se usa esta via de administração.

Uma exceção para este tratamento é quanto à triagem hipocrática. Neste os animais foram divididos em seis grupos experimentais: controle v.o. e i.p. (água destilada) e tratados 1000 mg/Kg e 2000 mg/Kg v.o. e i.p. para cada dose (extrato aquoso bruto liofilizado das folhas de *Tynanthus micranthus*).

**Tabela 8** – Fluxograma geral dos testes comportamentais realizados para a avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato bruto seco de folhas de *Tynanthus micranthus*

TESTE	GRUPOS TRATADOS (dose/via)					FINALIDADE
	Água	EA <i>Tynanthus micranthus</i>			Droga padrão	
<b>Hipocrático</b>	Controle, v.o. e i.p.	1000 mg/kg, v.o. e i.p.	2000 mg/kg, v.o. e i.p.		-	Toxicidade Aguda Efeitos e latência
<b>Suspensão pela cauda</b>	Controle v.o.	100 mg/Kg v.o.	300 mg/Kg v.o.	600 mg/Kg v.o.	IMI 45mg/kg v.o.	Ação antidepressiva
<b>Chaminé</b>	Controle v.o.	100 mg/Kg v.o.	300 mg/Kg v.o.	600 mg/Kg v.o.	DZP 2,5 mg/kg v.o.	Coordenação motora
<b>Sono induzido por éter etílico</b>	Controle v.o.	100 mg/Kg v.o.	300 mg/Kg v.o.	600 mg/Kg v.o.	DZP 1,0 mg/kg v.o.	Ação hipnosedativa
<b>Labirinto em cruz elevado</b>	Controle v.o.	100 mg/Kg v.o.	300 mg/Kg v.o.	600 mg/Kg v.o.	DZP 2,5 mg/kg v.o.	Ação ansiolítica
<b>Esconder esferas</b>	Controle v.o.	100 mg/Kg v.o.	300 mg/Kg v.o.	600 mg/Kg v.o.	DZP 2,5 mg/kg v.o.	Ação ansiolítica

<b>Campo-aberto</b>	Controle v.o.	100 mg/Kg v.o.	300 mg/Kg v.o.	600 mg/Kg v.o.	DZP 2,5 mg/kg v.o.	Ação ansiolítica
<b>Convulsão induzida por PTZ</b>	Controle v.o.	100 mg/Kg v.o.	300 mg/Kg v.o.	600 mg/Kg v.o.	DZP 2,5 mg/kg v.o.	Ação anticonvulsivante
<b>Convulsão induzida por eletrochoque máximo</b>	Controle v.o.	100 mg/Kg v.o.	300 mg/Kg v.o.	600 mg/Kg v.o.	Fenitoína 20 mg/kg i.p.	Ação anticonvulsivante

Extrato aquoso (EA); Imipramina (IMI); Diazepam (DZP)

### 3.6 Teste hipocrático ou Teste de Irwin

O teste hipocrático, ou também conhecido como teste de Irwin ou triagem farmacológica comportamental, é realizado por meio de observações comportamentais sistemáticas, fornecendo uma estimativa geral da toxicidade da substância sobre o estado consciente e disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central e sistema nervoso autônomo (CUNHA et al., 2009; MALONE; ROBICHAUD, 1983).

*Procedimento experimental:* Para a realização do teste hipocrático, os animais foram divididos em seis grupos experimentais, sendo cada grupo composto por três animais, conforme demonstrado na Tabela 9.

**Tabela 9** – Representação dos grupos, tratamentos, doses e vias de administração dos animais avaliados no teste de triagem hipocrática

Grupo	Tratamento / Dose	Via de administração
Controle	Água destilada	Via oral
Tratado 1000 mg/kg v.o.	EA <i>T. micranthus</i> – 1000 mg/kg	Via oral
Tratado 2000 mg/kg v.o.	EA <i>T. micranthus</i> – 2000 mg/kg	Via oral
Controle	Água destilada	Via intraperitoneal
Tratado 1000 mg/kg i.p.	EA <i>T. micranthus</i> – 1000 mg/kg	Via intraperitoneal
Tratado 2000 mg/kg i.p.	EA <i>T. micranthus</i> – 2000 mg/kg	Via intraperitoneal

Os animais foram tratados e observados 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 24 h após a administração e, a partir de então, diariamente, até o décimo dia, uma vez ao dia sempre no mesmo horário, para avaliar os efeitos relacionados às atividades do Sistema Nervoso Central (estimulante, depressora, entre outros), do Sistema Nervoso Autônomo (salivação, diarreia, entre outros) e a mortalidade dos animais (conforme protocolo de Triagem Farmacológica Comportamental – Anexo II).

Os efeitos observados nos animais tratados foram registrados respeitando uma escala de intensidade dos efeitos, sendo (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente e (++) efeito intenso, para posteriormente serem analisados.

### **3.7 Testes Comportamentais – Avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva**

A avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva de determinadas substâncias é realizada por meio de modelos comportamentais. Estes se baseiam na reatividade emocional dos animais, resultando em comportamentos como o de exploração de um ambiente ou de esquivas (KALUEFF; TUOHIMAA, 2004; KALUEFF; WHEATON; MURPHY, 2007). Porém, determinadas substâncias presentes em extratos vegetais, por exemplo, poderão apresentar atividades como hipotensão, hipotermia, sedação, relaxamento muscular e incoordenação motora, podendo mascarar os efeitos centrais específicos dos compostos. Por esse motivo, recomenda-se a realização de testes gerais associados à testes específicos (LAPA et al., 2008).

Para a avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva, foram realizados os testes: labirinto em cruz elevado, teste de esconder esferas e campo-aberto (ação ansiolítica), teste da chaminé (coordenação motora), sono induzido por éter etílico (ação hipno-sedativa), convulsões induzidas quimicamente por pentilenotetrazol, convulsões induzidas por eletrochoque máximo (ação anticonvulsivante) e suspensão pela cauda (antidepressiva), conforme descritos a seguir.

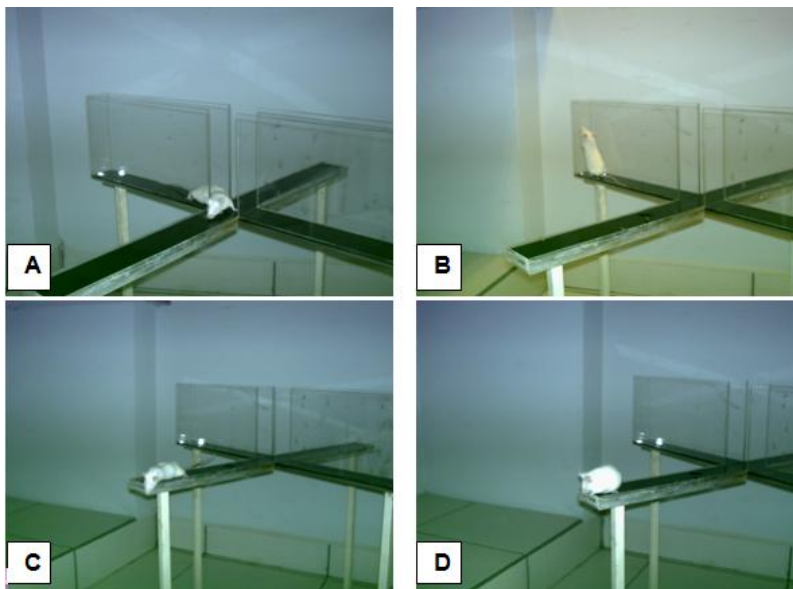
#### **3.7.1 Teste Labirinto em Cruz Elevado**

O teste de labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos principais testes na investigação de ansiedade (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; PELLOW et al., 1985) utilizando-se ratos e camundongos (LISTER, 1987). A partir dele, foram desenvolvidas várias adaptações, incluindo o labirinto em T elevado e o labirinto em zero (BOURIN et al., 2007; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; CRYAN; HOLMES, 2005). O LCE tem sido amplamente utilizado como ferramenta na investigação da base da ansiedade psicológica e neuroquímica, para triagem de drogas moduladoras da ansiedade ou genótipos de camundongos (BOURIN et al., 2007).

O LCE consiste de dois braços abertos opostos (30 cm x 5 cm) cruzados em ângulo reto com dois braços cercados lateralmente (30 cm x 5 cm) por uma parede de 15 cm de altura (braços fechados). Os quatro braços delimitam uma área de 5 x 5 cm, chamada de plataforma central. O aparelho permanece elevado do chão a uma altura de 30 cm, podendo apresentar uma borda de 0,25 cm de altura nos braços abertos para evitar a queda dos animais, conforme ilustrado na Figura 23.

O LCE é baseado na aversão natural de roedores para espaços abertos e usa o conflito entre a exploração e aversão a este tipo de lugar. Os perfis de comportamento provocados no LCE são semelhantes aos de neofobia, exploração e a aproximação / evitar conflitos, assim, o aparelho é muitas vezes referido como um modelo de conflito comportamental espontâneo não-condicionado.

Durante um determinado período, são avaliados diversos parâmetros, dentre eles, o tempo de permanência no braço aberto/fechado, número de entradas, em ambos os braços e o tempo de permanência na plataforma central. Além disso, avaliam-se também medidas de avaliação etológica, como por exemplo, o número de “head-dippings” (imersões de cabeça), “rearings” (levantar) e “stretch attend posture” (estiramento corporal) (SCHMIDT; MÜLLER, 2006).



**Figura 23** - Comportamentos (A - *stretch attend posture*/ estiramento; B - *rearing*/ levantar; C - *head-dipping*/ imersão de cabeça; D - exploração do fim do braço aberto) apresentados no labirinto em cruz elevado. Fotografias gentilmente cedidas por Filipe Silveira Duarte.

*Procedimento experimental:* Os animais pré-tratados com extra- foram colocados individualmente na plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços fechados, sendo o comportamento observa-

do por 5 min. A avaliação dos parâmetros comportamentais ocorreu em uma sala com luz vermelha (15 W), sendo o experimento filmado por sistema de câmeras interligado à um computador, pelo programa Multicam Surveillance System 7.0-GV-800®, para posterior visualização e análise do comportamento. Após o teste de cada animal, o LCE foi limpo com solução etanol 10 % e seco com papel toalha (PELLOW et al., 1985; RODGERS et al., 1997).

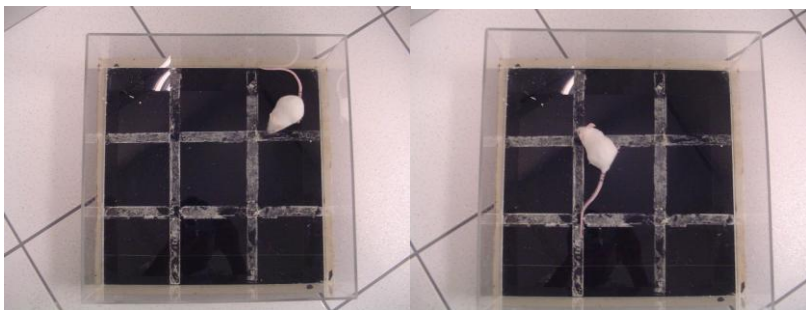
O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o.) foi administrado aos animais do grupo controle positivo 30 min antes do teste. O grupo controle foi tratado na mesma via, 1 h antes do teste, com água destilada.

As medidas comportamentais registradas no LCE foram: frequência de entradas e de tempo despendido nos braços abertos, obtidos, respectivamente, pela relação entre: a frequência de entradas e tempo despendido nos braços abertos, dividido pelo número total de entradas e tempo total despendido nos braços do LCE x 100. Foram também registradas medidas de avaliação etológica como o número de imersões de cabeça, postura de avaliação de risco ou estiramentos corporais, comportamento de levantar e auto-limpeza (RODGERS et al., 1997). Foi considerado como entrada em um dos braços do labirinto, quando o animal colocou as quatro patas dentro do respectivo braço, e como saída quando o animal saiu com as quatro patas de um dado braço. O comportamento de imersão de cabeça foi registrado quando o animal explorava a área abaixo da plataforma do LCE, e a avaliação de risco ou estiramentos corporais quando o animal, mantendo as patas traseiras fixas no chão do aparelho, estirava os membros dianteiros e retornava a posição inicial. Entendeu-se por comportamento de levantar a manutenção do corpo apenas com as patas traseira no chão do LCE, e as patas dianteiras apoiadas ou não na parede do aparelho. Quando o camundongo lambeu seus membros ou pêlos, este comportamento foi registrado como atividade de auto-limpeza.

### **3.7.2 Teste Campo Aberto**

Este teste consiste em colocar um animal em um ambiente desconhecido, um cercado por paredes (Figura 24), no qual são observados parâmetros de comportamento como, por exemplo, o tempo de permanência na periferia e a permanência no centro do campo. Os animais são testados individualmente, sempre sendo colocados na mesma posição no centro do campo. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pelo ambiente novo (BOURIN et al., 2007). Assim, esse teste permite uma avaliação da atividade estimulante ou depressora de um dado composto, podendo

ainda indicar atividades mais específicas como a ansiolítica, dependendo do tamanho do equipamento e dos parâmetros avaliados (LAPA et al., 2008). Tratamentos ansiolíticos não aumentam a exploração no campo aberto, mas diminuem o estresse induzido por inibição do comportamento de exploração. Trata-se de um teste sensível aos efeitos dos benzodiazepínicos e agonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (BOURIN et al., 2007).



**Figura 24** - Campo-aberto (*open-field*), de tamanho 30 x 30 cm (comprimento x largura). Fotografia do arquivo do Laboratório de Neurofarmacologia – FMC/CCB – UFSC.

*Procedimento experimental:* Os animais pré-tratados com o extrato foram colocados individualmente no centro do campo-aberto confeccionado de acrílico (50 x 50 x 40 cm) com o chão preto e as paredes laterais transparentes, sendo o comportamento observado por 5 min. A avaliação dos parâmetros comportamentais ocorreu em uma sala com luz vermelha (15 W), sendo o experimento filmado por sistema de câmeras interligado a um computador, pelo programa Multicam Surveillance System 7.0-GV-800®, para posterior visualização e análise do comportamento, através do programa ANY-maze Video Tracking System®. Após o teste de cada animal, o LCE foi limpo com solução etanol 10 % e seco com papel toalha (PELLOW et al., 1985; RODGERS et al., 1997).

O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o.) foi administrado aos animais do grupo controle positivo 30 min antes do teste. O grupo controle foi tratado na mesma via, 1 h antes do teste, com água destilada.

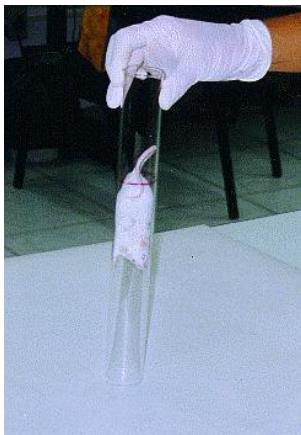
As medidas comportamentais registradas no campo-aberto foram: tempo de permanência no centro e periferia; distância percorrida no centro, periferia e total; velocidade média no centro, periferia e total; nº de entradas no centro; o número de comportamentos de auto-limpeza



(“grooming”), de levantar (“rearing”), assim como o tempo em que permanece parado (imobilidade).

### 3.7.3 Teste da Chaminé

A avaliação do desempenho motor pode ser feito utilizando diversos testes, como o teste da chaminé, teste do arame e o teste do “rota-rod”. No teste da chaminé (Figura 25), os animais são introduzidos dentro de um tubo de vidro simples (25 cm de comprimento e 2,5-3cm diâmetro interno) na posição horizontal, e ao alcançarem a extremidade oposta, o tubo é colocado na posição vertical. A reação normal do animal é a de subir de marcha-ré. O desempenho motor é avaliado pelo tempo que o animal leva para atingir uma determinada marca (situada a 10 cm da extremidade) movimentando-se em marcha-ré, sendo considerados os animais com comprometimento motor os que forem incapazes de atingirem a marca dentro de um período de tempo determinado (COLETA et al., 2006; GRÖTICKE et al., 2007; LAPA et al., 2008).



**Figura 25** - Teste da chaminé (chimney test). Fotografia do arquivo do Laboratório de Neurofarmacologia – FMC/CCB – UFSC.

*Procedimento experimental:* Os animais pré-tratados com o EA foram introduzidos individualmente na extremidade do tubo de vidro que possui a marca, em posição horizontal. No momento em que os animais alcançaram a extremidade oposta, o tubo foi colocado em posição vertical, registrando-se o tempo que o animal levou para alcançar a marca, movendo-se de marcha-ré. Os animais que não desempenharam essa tarefa no tempo de 30 s foram considerados com prejuízo na sua

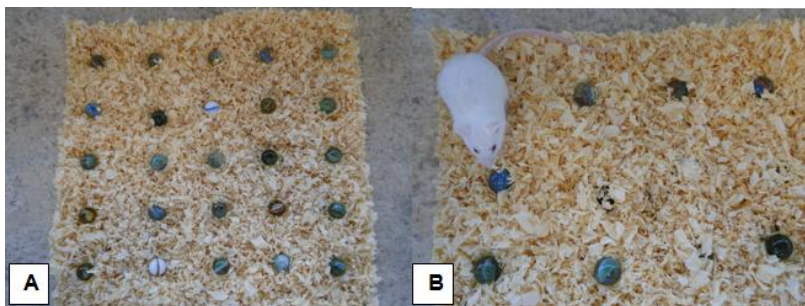
coordenação motora. Após o teste de cada animal, o tubo de vidro foi limpo com solução etanol 10 % e seco com papel toalha (PELLOW et al., 1985; RODGERS et al., 1997).

O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o.) foi administrado aos animais do grupo controle positivo 30 min antes do teste. O grupo controle foi tratado na mesma via, 1 h antes do teste, com água destilada.

#### **3.7.4 Teste de Esconder Esferas**

Os camundongos apresentam um comportamento espontâneo de enterrar materiais aversivos presentes em seu ambiente, como objetos, alimentos desagradáveis, pequenos predadores, sendo caracterizado como um comportamento defensivo refletindo no estado de ansiedade dos animais. O teste de esconder esferas é caracterizado por avaliar o comportamento do animal no que diz respeito à tentativa de esconder objetos potencialmente “perigosos”, sendo este comportamento reduzido ou suprimido pela ação de drogas ansiolíticas (LAPA et al., 2008; NICOLAS et al., 2006).

O teste de esconder esferas pode ser utilizado como uma ferramenta na avaliação de substâncias ansiolíticas, porém apresenta validade preditiva limitada para ansiedade, uma vez, que outros compostos também poderão reduzir esse comportamento. Para a realização deste teste utiliza-se uma caixa de vidro transparente (31 x 38 x 20 cm), forrada com serragem (com aproximadamente 3 cm de altura, levemente compactada), na qual são distribuídas esferas de vidro claras (aproximadamente 1,5 cm de diâmetro), proporcionando reflexo das mesmas (Figura 26). O animal é colocado na caixa de vidro, sendo avaliada a quantidade de bolinhas escondidas, com serragem, em um período de tempo determinado.



**Figura 26** - Teste de esconder esferas (marble-burying test), demonstrando (A) a caixa de vidro com a distribuição das 25 esferas de vidro e (B) o camundongo Swiss escondendo as mesmas com serragem. Fotografia do arquivo do Laboratório de Neurofarmacologia – FMC/CCB – UFSC.

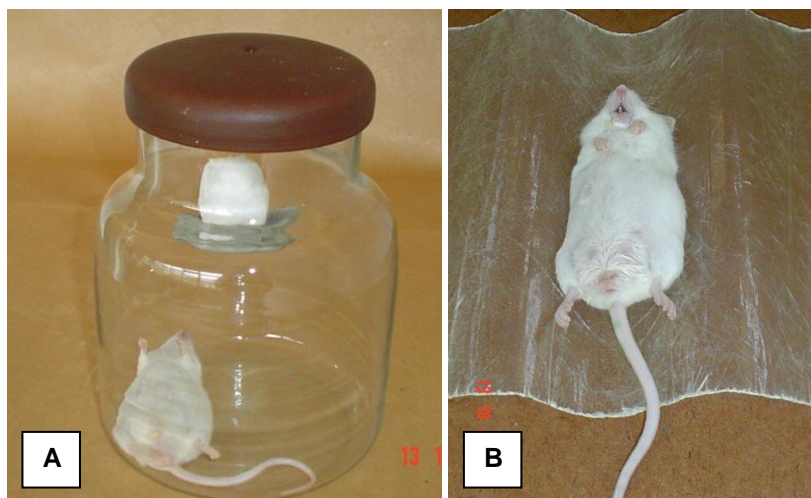
*Procedimento experimental:* Os animais pré-tratados com o EA foram introduzidos individualmente na caixa de vidro, contendo 25 esferas de vidros distribuídas sobre a serragem. Após o período de 15 min, retirou-se o animal da caixa. Foi registrado a quantidade de esferas de vidro escondidas com serragem (LAPA et al., 2008; NICOLAS et al., 2006). Após o teste de cada animal, foi realizada a troca da serragem e as esferas de vidro foram limpas com solução etanol 10 % e seco com papel toalha (PELLOW et al., 1985; RODGERS et al., 1997).

O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o.) foi administrado aos animais do grupo controle positivo 30 min antes do teste. O grupo controle foi tratado na mesma via, 1 h antes do teste, com água destilada.

### 3.7.5 Sono Induzido por éter etílico

Drogas depressoras centrais geralmente reduzem a latência e/ou aumentam a duração do sono induzido. O teste de sono induzido por barbitúrico, utilizando pentobarbital sódico é a mais empregada para avaliação da atividade hipno-sedativa. Entretanto, drogas metabolizadas no fígado podem alterar os resultados por uma possível interação farmacocinética, gerando resultados falso-positivos. Desta forma, é preferível optar por um modelo no qual o indutor de sono não seja metabolizado pelo fígado, como o éter etílico (LAPA et al., 2008).

Trata-se de um teste onde o animal é induzido ao sono (perda do reflexo postural) por éter etílico, avaliando-se necessário para que o animal recupere a postura normal (Figura 27) (LAPA et al., 2008).



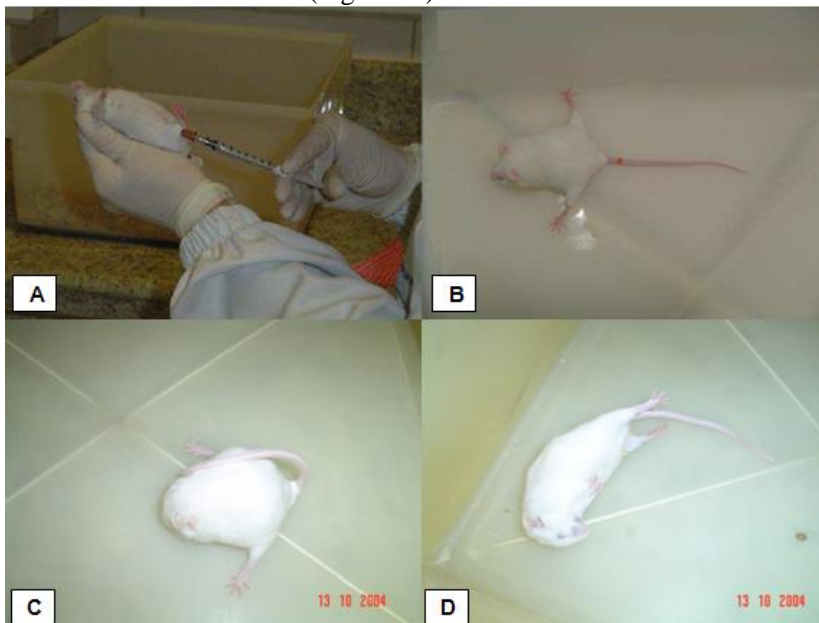
**Figura 27** - Sono induzido por éter etílico. (A) Animal com perda de reflexo postural no interior da câmara de vidro e (B) Animal em decúbito dorsal para registro do tempo total do sono. Fotografia do arquivo do Laboratório de Neurofarmacologia – FMC/CCB – UFSC.

*Procedimento experimental:* Os animais pré-tratados com o EA foram colocados individualmente em uma câmara de vidro transparente (30 cm X 20 cm de diâmetro), saturada de éter etílico, sobre uma plataforma, até perderem o reflexo postural (início do sono), deixando na câmara por mais 1 min. Em seguida, o animal foi retirado e deixado em decúbito dorsal até recuperação do reflexo postural. A saturação da câmara foi obtida umedecendo duas bolas de algodão de tamanho padrão (3 g) com éter etílico (3 mL em cada bola), colocadas uma na base da câmara (embaixo da plataforma) e a outra a 20 cm de altura em relação a base da câmara, sendo as mesmas substituídas a cada 3 min. Foram registrados: a latência para a perda do reflexo postural e o tempo total de duração do sono (em segundos).

O diazepam (DZP – 1,0 mg/kg, v.o.) foi administrado aos animais do grupo controle positivo 30 min antes do teste. O grupo controle foi tratado na mesma via, 1 h antes do teste, com água destilada (VIEIRA, 2001; DUARTE et al., 2007).

### 3.7.6 Convulsões induzidas por pentilenotetrazol

O teste das convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) é considerado o principal teste experimental agudo para avaliação preliminar de drogas com potencial atividade anticonvulsivante (SWINYARD et al., 1952). Neste teste, aplica-se PTZ no animal e em seguida, são registrados alguns parâmetros relacionados ao tempo de latência e duração da primeira convulsão clônica, assim como o tempo de morte e severidade das convulsões (Figura 28).



**Figura 28** - Convulsão induzida por pentilenotetrazol. (A) Animal sendo tratado com PTZ (80 mg/kg, i.p.); (B) Animal apresentando um abalo mioclônico, (C) crise clônica e (D) extensão tônica após a injeção de PTZ. Fotografia do arquivo do Laboratório de Neurofarmacologia – FMC/CCB – UFSC.

Drogas que aumentam a latência para a primeira convulsão ou impedem essas convulsões e/ou diminuem a duração ou a letalidade das mesmas correlacionam-se positivamente com as drogas usadas no tratamento das epilepsias do tipo crise de ausência em humanos (SWINYARD et al., 1952).

*Procedimento experimental:* Uma hora após o tratamento oral com as diferentes preparações, os animais receberam uma aplicação de pentilenotetrazol (PTZ – 80 mg/Kg, s.c.), sendo colocados em caixas individuais para observação, registrando-se os seguintes parâmetros durante o período de 30 min: tempo de latência para a ocorrência da primeira convulsão clônica; duração desta convulsão; e severidade das convulsões, avaliada por meio da somatória do total de escores atribuídos de acordo com a escala proposta por Czuczwar e Frey, em 1986, e apresentada na Tabela 10.

**Tabela 10** – Descrição dos escores atribuídos conforme a severidade da convulsão, de acordo com a escala proposta por Czuczwar e Frey, em 1986

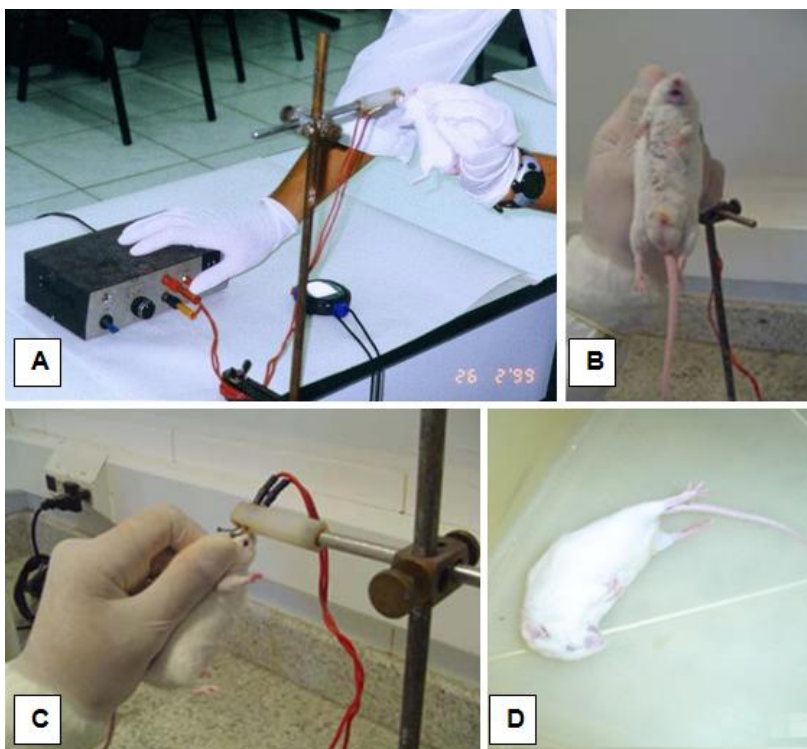
ESCORES ATRIBUÍDOS	DESCRIÇÃO DA CONVULSÃO
1	abalos mioclônicos
2	convulsão clônica sem perda do reflexo postural
3	convulsão clônica com perda do reflexo postural;
4	convulsão tônica sem morte
5	convulsão tônica seguida de morte

O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o.) foi administrado aos animais do grupo controle positivo 30 min antes do teste. O grupo controle foi tratado na mesma via, 1 h antes do teste, com água destilada.

### 3.7.7 Convulsões induzidas por Eletrochoque corneal

O teste das convulsões induzidas por eletrochoque corneal também é um teste para investigar uma possível atividade anticonvulsivante. A diferença é que as drogas que impedem o aparecimento de convulsões ou bloqueiam o componente extensor dessas convulsões correlacionam-se, em geral, com aquelas empregadas clinicamente nas epilepsias do tipo tonico-clonica generalizada (SWINYARD et al., 1952)

Neste teste, é aplicado um estímulo elétrico nos olhos do animal (eletrochoque transcorneal máximo) levando à convulsão (Figura 29). São registrados parâmetros como o tempo de extensão das patas posteriores e recuperação das convulsões induzidas e taxa de letalidade.



**Figura 29** – Representação da convulsão induzida por eletrochoque máximo, sendo possível observar em (A) a geradora de eletrochoque; (B) forma de como o camundongo foi contido durante o estímulo elétrico; (C) posição do camundongo perante ao equipamento, com olhos próximos aos eletrodos e em (D) extensão das patas exteriores após o estímulo elétrico. (A e D) Fotografias do arquivo do Laboratório de Neurofarmacologia – FMC/CCB – UFSC; (B e C) Fotografias gentilmente cedidas por Filipe Silveira Duarte.

*Procedimento experimental:* Os animais pré-tratados com EA foram submetidos ao eletrochoque transcorneal máximo (60 Hz, 50 mA, 0,2s). Em seguida, os mesmos foram colocados em caixas individuais para observação, registrando-se os seguintes parâmetros: tempo de extensão das patas posteriores, tempo de recuperação e taxa de letalidade.

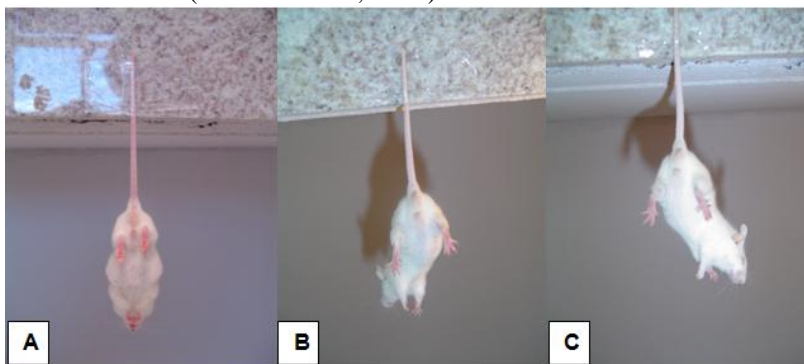
A fenitoína (20 mg/kg, i.p.) foi administrado aos animais do grupo controle positivo 1 h antes do teste. O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o.) foi administrado aos animais 30 min antes do teste para



comparação dos efeitos apresentados. O grupo controle foi tratado na mesma via, 1 h antes do teste, com água destilada.

### 3.7.8 Teste Suspensão pela Cauda

O teste de suspensão pela cauda é um teste derivado do teste de nado forçado, sendo um procedimento bastante utilizado para a avaliação e identificação de novos compostos com possíveis ações antidepressivas (BOURIN et al., 2005; CRYAN et al., 2005). O teste baseia-se em um princípio semelhante ao observado no nado forçado, pois o camundongo fica suspenso pela cauda alternando em períodos de agitação e imobilidade (Figura 30). O tempo de imobilidade e de agitação é avaliado durante um período de 5 min (BOURIN et al., 2005). Os antidepressivos utilizados na clínica diminuem o tempo de imobilidade dos animais neste teste (CRYAN et al., 2005).



**Figura 30** - Teste de suspensão pela cauda, representando (A) imobilidade e (B e C) agitação. Fotografia do arquivo do Laboratório de Neurofarmacologia – FMC/CCB – UFSC.

*Procedimento experimental:* Os animais pré-tratados com EA foram suspensos pela cauda, com o auxílio de fita adesiva, na bancada de experimentação, a uma altura de 70 cm do solo. Depois de suspensos e fixos, os animais foram observados individualmente durante 5 min, sendo registrados os seguintes parâmetros: tempo de latência para o início da imobilidade (definida como a ausência total de movimentação do animal) e tempo total de imobilidade. Ambas as medidas foram registradas em segundos.

A imipramina (IMI – 45 mg/kg, v.o.), droga utilizada na clínica como antidepressiva, foi administrada aos animais do grupo controle



positivo 1 h antes do teste e o grupo controle foi tratado na mesma via e tempo com água destilada.

### 3.8 Análise Estatística

Os dados paramétricos foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). As comparações estatísticas dos dados foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Dunnett, e teste “t” de Student para os dados da droga-padrão.

Os dados não paramétricos foram expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil. As comparações estatísticas dos dados foram realizadas pelo teste Kruskal-Wallis, seguido do teste *post-hoc* de Dunn, e teste de Mann-Whitney para os dados da droga-padrão.

A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi de  $p \leq 0,05$ . Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o programa estatístico *Graph-Pad Prism 5.00.288*®.

### 3.9 Cálculo de custos do projeto

O termo projeto se refere a um conjunto de ações, realizadas de forma coordenada por uma organização temporária, onde são alocados os insumos necessários para alcançar um objetivo em um determinado prazo. Para o controle das atividades são aplicadas ferramentas de gestão, como planejamento, organização e execução, durante todo o período do projeto (PINHEIRO et al., 2006; VALERIANO, 1998).

Em áreas de Pesquisa & Desenvolvimento de Indústrias Farmacêuticas, é freqüente a discussão referente aos investimentos necessários para a execução de uma proposta de projeto de P&D, assim como o tempo necessário para que o mesmo seja concluído, originando produtos com valor agregado que proporcionarão um retorno financeiro à empresa dos investimentos feitos. Sendo assim, a análise de custos referente a todas as atividades envolvidas em cada projeto apresenta grande importância na decisão de aprovação ou não de uma proposta de projeto.

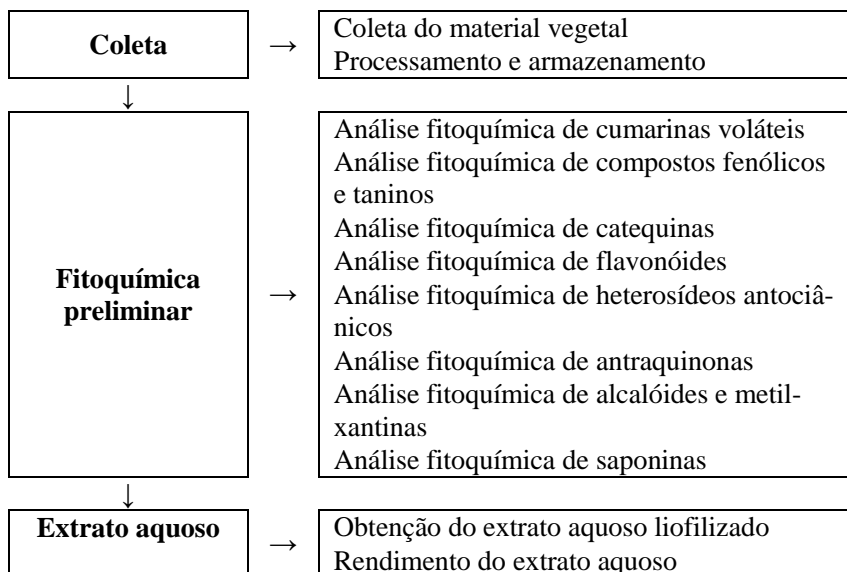
Para cada projeto, normalmente cria-se um arquivo com todas as informações relevantes ao mesmo, como o responsável/equipe envolvido com a execução do mesmo, literatura de apoio, metodologias e protocolos utilizados, resultados obtidos, possíveis parcerias, custo estimado do projeto, cronograma de execução, entre outras (PINHEIRO et al., 2006).

A análise de custo realizada antes da execução do projeto tem uma precisão de apenas 50%, sendo essa precisão aumentada com a

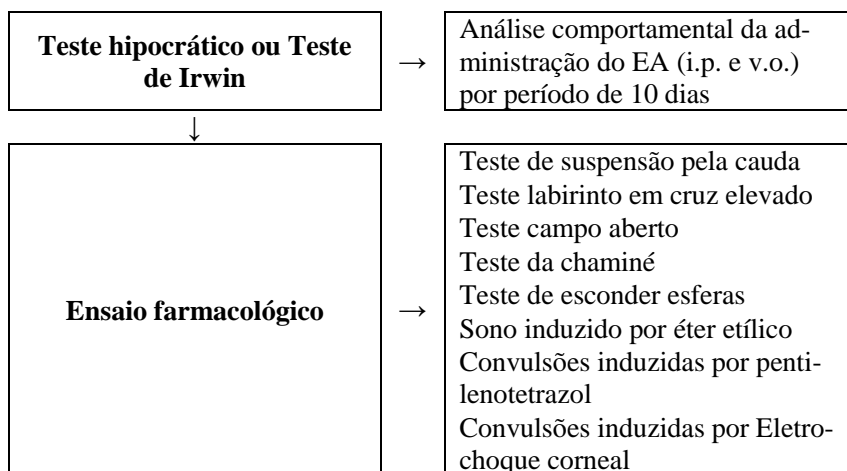
execução do projeto, avaliando-se os custos reais do mesmo (PHARMAKO CONSULTORIA, 2008). O valor obtido na análise de custo antes da sua execução refere-se a um valor estimado, podendo ser dividido por atividades ou etapas, o que possibilita a empresa desenvolver um planejamento econômico para os projetos. Além disso, essa estimativa permite conhecer os investimentos necessários em cada projeto e no conjunto de projetos da área (PHARMAKO CONSULTORIA, 2008; PINHEIRO et al., 2006).

Durante a execução do projeto, mesmo havendo uma análise dos custos de suas atividades ou etapas no momento da aprovação da proposta, pelo fato deste nem sempre condizer com o valor gasto, empresas normalmente realizam análises orçamentárias após a execução de uma etapa ou nível do projeto. Isto serve como uma ferramenta de acompanhamento, sendo o momento onde é levado em consideração a viabilidade de continuar com a execução do mesmo, tendo-se a continuação de investimentos, ou de se estabelecer parcerias com instituições privadas ou estaduais, como empresas ou universidades, para dar ao projeto (PINHEIRO et al., 2006).

No presente trabalho, optou-se pela análise de custo das atividades realizadas até o momento, sendo estas divididas por níveis e etapas, conforme ilustrado nas Figuras 31 e 32. Além das atividades classificadas como Nível I e Nível II, foi avaliado também os custos de Manutenção do Biotério e Manutenção do extrato liofilizado em *freezer*.



**Figura 31** – Distribuição das etapas e atividades realizadas no presente trabalho, classificadas como Nível I (*in vitro*).



**Figura 32** - Distribuição das etapas e atividades realizadas no presente trabalho, classificadas como Nível II (*in vivo*).

Para o cálculo de custo das atividades realizadas no presente trabalho, foi considerado o caso de a empresa apresentar estrutura apro-

priada para esta finalidade (estrutura física, equipamentos, reagentes e funcionários qualificados). Não será abordado o investimento necessário para que uma empresa monte essa estrutura e nem o período em que ela passará a apresentar retorno financeiro de tal investimento.

O custo das atividades executadas foi calculado utilizando a fórmula abaixo:

Custo das atividades =	(Custo de mão-de-obra direta + Custo do material aplicado + Depreciação contábil)
------------------------	---

Em cada atividade, foi realizado um levantamento de informações quanto ao tempo despendido pelo analista na realização de cada atividade, quantidade de material consumido (reagentes e demais materiais) e tempo de utilização de cada equipamento. Com isso, foi possível calcular o custo de mão-de-obra, custo do material aplicado, custo de depreciação dos equipamentos e veículo, resultando em um valor que representa o custo do serviço realizado.

### 3.9.1 Custo de mão-de-obra direta

O custo de mão-de-obra direta envolve os gastos com mão-de-obra e a capacidade produtiva de um funcionário. O gasto com mão-de-obra é o valor total dos gastos com os funcionários da empresa que executam os serviços realizados. Nestes gastos, considerou-se o salário bruto e os encargos sobre o salário (férias, 13º salário, FGTS, rescisões trabalhistas, entre outros) durante um período. Enquanto que a capacidade produtiva é o total de horas efetivas que os funcionários executam os serviços, dentro de um mesmo período (QUEIROZ FILHO, 2003; SEBRAE, 2006).

Por tanto, para calcular o custo de mão-de-obra direta, por etapa, utilizou-se a fórmula abaixo:

$$\text{Custo mão-de-obra direta} = \frac{\text{Salário mensal} + \text{encargos}}{\text{Horas trabalhadas mensal}}$$

$$\text{Custo mão-de-obra direta} = \Sigma \text{ dos custos mão-de-obra direta de todas as atividades}$$

### 3.9.2 Custo do material aplicado

O custo do material aplicado é o custo de todos os materiais consumíveis utilizados para realizar as atividades. Para isto, avalia-se a quantidade utilizada e o valor pago para cada material, sendo o valor do custo, por etapa, calculado proporcional a quantidade consumida período (QUEIROZ FILHO, 2003; SEBRAE, 2006), através das fórmulas:

Custo do material consumido =	$\frac{\text{(Quantidade utilizada xValor pago durante a compra)}}{\text{Quantidade comprada}}$
----------------------------------	---

Custo do material aplicado = $\Sigma$ dos custos dos materiais consumidos de todas as atividades
--

Os custos com a aquisição dos animais para a realização de cada experimento foram somados ao custo do material aplicado. O custo referente aos gastos com ração e maravalha, durante o período em que os mesmos permaneceram no biotério até serem utilizados, foram calculados no item Manutenção do Biotério.

### 3.9.3 Depreciação contábil

Dentro das despesas consideradas despesas fixas têm-se a depreciação, sendo um valor relativo ao desgaste do bem pelo uso, ação da natureza e/ou obsolescência. Em empresas onde ocorre a venda ou prestação de serviços, este valor está incluso nos preços cobrados aos clientes, possibilitando a reposição desse investimento, conhecido como bem (um equipamento, por exemplo), quando este já estiver sem condições de uso período (QUEIROZ FILHO, 2003; SEBRAE, 2006).

No presente trabalho, foi calculado o valor de depreciação contábil devido a sua utilização, ou seja, o valor de depreciação proporcional ao tempo que o equipamento ou veículo foi utilizado. Trata-se de depreciação contábil, pois o tempo de vida útil considerado para cada equipamento foi de dez anos e de veículo de cinco anos, conforme determinado pela Receita Federal (BRASIL, 2011). Existem outras formas de se calcular a depreciação, que levam em consideração o tempo vida útil real de um bem período (QUEIROZ FILHO, 2003; SEBRAE, 2006). As demais despesas fixas não foram levantadas, pois estão relacionadas com todos os departamentos e atividades da empresa.

A depreciação contábil dos bens utilizados foi calculada conforme a fórmula a seguir:

$$\text{Depreciação contábil} = \frac{\text{Valor pago para o equipamento}}{\text{Tempo de vida útil (anos)}}$$

$$\text{Depreciação contábil} = \Sigma \text{ dos valores de depreciação contábil dos equipamentos utilizados para uma mesma etapa, proporcional ao tempo utilizado}$$

### 3.9.4 Considerações gerais

Como foi comentado anteriormente, o cálculo dos custos de mão-de-obra direta, custo do material aplicado e depreciação contábil foram feitos proporcionais ao tempo necessário para a execução de cada etapa. Os itens contabilizados em cada uma delas estão descritas na Tabela 11.

Os resultados foram expressos em valores monetários (R\$) calculados para cada etapa, assim como os valores monetários (R\$) para a manutenção do biotério e do extrato liofilizado em freezer até o momento em que foram utilizados os animais para a avaliação das atividades em da utilização do extrato liofilizado.

Além disso, os valores totais para cada categoria de custo avaliado foi expressa em porcentagem, baseado no custo total do trabalho.

**Tabela 11** – Itens avaliados para cálculo de custos de mão-de-obra, material aplicado e depreciação contábil referente a cada etapa de atividades realizadas para a avaliação preliminar do EA de *Tynanthus micranthus*

<b>NÍVEL / ETAPA</b>	<b>CUSTO DE MÃO-DE-OBRA DIRETA</b>	<b>CUSTO DO MATERIAL APLICADO</b>	<b>DEPRECIAÇÃO CONTÁBIL</b>
<b>Nível I (<i>in vitro</i>)</b>			
Coleta	Viagem, coleta, classificação e processamento	Combustível e material de escritório para identificação	Veículo, utensílios para coleta e equipamentos para o processamento
Fitoquímica preliminar	Preparo das soluções, realização da análise e avaliação dos resultados	Reagentes	Equipamentos
Extrato aquoso	Preparo, processamento, armazenamento e avaliação dos resultados	Filtros	Equipamentos
<b>Nível II (<i>in vivo</i>)</b>			
Teste hipocrático	Preparo das soluções, experimentos e avaliação dos resultados	Seringas, agulhas e animais	Cânulas de gavagem e equipamentos
Ensaio farmacológico	Preparo das soluções, experimentos e avaliação dos resultados	Seringas, agulhas, reagentes, serragem (teste de esconder esferas) e animais	Cânulas de gavagem e equipamentos
<b>Manutenção Biotério</b>	Limpeza e manutenção	Serragem e ração	Estante climatizada para camundongos, caixas e

			bebedouros
<b>Manutenção Extrato</b>	Armazenamento	-	Freezer



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise fitoquímica preliminar

A Tabela 12 demonstra os resultados para os testes realizados para a avaliação fitoquímica preliminar de grupos químicos de metabólitos encontrados nas folhas da planta *Tynanthus micranthus*. Como pode ser observado, as reações foram positivas para cumarinas voláteis, polifenóis, taninos, catequinas, flavonóides e saponinas.

Para flavonóides, observou-se que os resultados obtidos nas diferentes reações indicam a presença de flavona, semelhante ao resultado encontrado por Cansian (2010) em frações clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica na raiz, caule e folhas da planta *T. micranthus*. Enquanto que para saponinas, ocorreu reação positiva para a Reação de Sal-kowski, indicando a presença e núcleo esteroidal.

**Tabela 12** – Avaliação fitoquímica preliminar das folhas de *Tynanthus micranthus*

COMPOSTO	RESULTADO
Cumarinas voláteis	+
Polifenóis	+
Taninos	+
Catequinas	+
Flavonóides	+
Heterosídeos antociânicos	-
Antraquinonas	-
Alcalóides	-
Metilxantinas	-
Saponinas	+

### 4.2 Rendimento do extrato aquoso bruto

O extrato aquoso bruto das folhas de *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo ex K. Schum apresentaram 2,12 mg de resíduo seco por mL de extrato, representando um rendimento médio de  $16,76 \pm 0,22\%$ .

O resíduo seco obtido apresentou coloração marrom, sendo solúvel em água e higroscópico.

### 4.3 Teste hipocrático ou teste de Irwin

Durante o teste hipocrático observou-se efeitos importantes para selecionar o tempo entre a administração do extrato e a avaliação das atividades comportamentais, além de proporcionar um direcionamento do estudo quanto aos possíveis efeitos que o extrato apresenta. A Tabela

13 representa os principais efeitos encontrados nos animais tratados com EA das folhas de *Tynanthus micranthus*, nas doses de 1000 mg/Kg e 2000 mg/Kg (v.o. e i.p.), quando comparados ao grupo controle. Os principais efeitos foram observados nos tempos de 30 min, 1 h, 2 h e 3 h. A partir deste tempo não foram observados efeitos significativos, quando comparados com o grupo controle.

Dentre os efeitos observados, destacaram-se a analgesia (30 min a 3 h), a sedação (30 min a 2 h, em grupos tratados por via i.p.) e a pilo-ereção (30 min a 1 h) devido à intensidade e duração do mesmo, bem como a concentração e a via de administração do extrato. Além disso, não houve mortalidade dos animais observados, o que indica uma baixa toxicidade aguda desta planta.

**Tabela 13** – Principais efeitos observados, no teste hipocrático, em camundongos Swiss após tratamento agudo com EA das folhas de *Tynanthus micranthus*

Atividade farmacológica	Tempo após administração															
	30 min				1 h				2 h				3 h			
	Grupos tratados															
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
<b>a - Estimulante</b>																
Tremores	0	0	+	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloereção	+	+	++	++	+	0	++	++	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>b - Depressora</b>																
Ptose	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sedação	0	0	++	++	0	0	++	++	0	0	+	+	0	0	0	0
Analgesia	0	++	0	++**	++ *	++	++ **	++**	++*	++	++	++**	++ **	++ **	++ **	++**
<b>2 – SN Autônomo</b>																
Diarréia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++ *
Defecação diminuída	0	0	+	++	0	0	+	++	0	0	0	+	0	0	0	0
Respiração forçada	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Micção	-	-	0	++	-	-	0	++	-	-	0	0	0	-	0	0

A= tratado 1000 mg/Kg v.o.; B= tratado 2000 mg/Kg v.o.; C= 1000 mg/Kg i.p.; D= 2000 mg/Kg i.p.; (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente e (++) efeito intenso. \* efeito observado em 1/3 animais do grupo, \*\* efeito observado em 2/3 animais do grupo.

#### 4.4 Testes Comportamentais – Avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva

##### 4.4.1 Teste Labirinto em Cruz Elevado

Os resultados referentes às medidas comportamentais registradas no labirinto em cruz elevado são apresentados nas Figuras 33, 34 e 35.

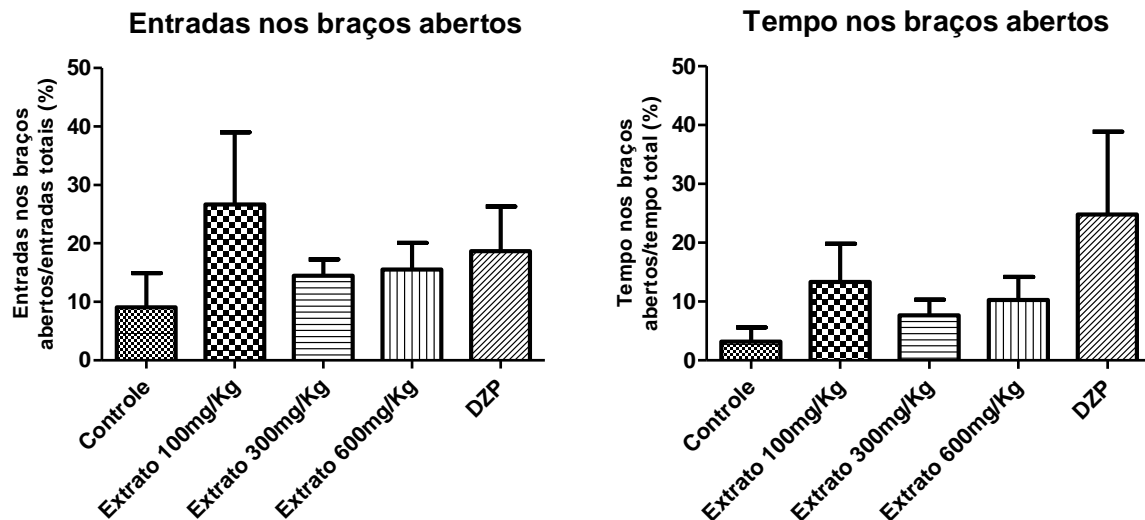
Para as medidas comportamentais registradas no labirinto em cruz elevado de entradas e tempo despendido nos braços abertos, expressos em (%) (Figura 33), para o EA das folhas de *Tynanthus micranthus*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/Kg, administrado por via oral, não foi observado aumento significativo ( $p > 0,05$ ) para essas medidas [ $F(3,16) = 1,016$ ;  $p = 0,4114$  e  $F(3,16) = 1,052$ ;  $p = 0,3968$ , respectivamente], quando comparado com o grupo controle. Com o tratamento com diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o.) também não foi possível visualizar um aumento significativo ( $p > 0,05$ ) nessas medidas comportamentais avaliadas [ $t(7) = 1,014$ ;  $p = 0,3443$  e  $t(7) = 1,710$ ;  $p = 0,1310$ , respectivamente], quando comparado com o grupo controle.

Para as avaliações etológicas de estiramento corporal e imersões de cabeça, registradas no labirinto em cruz elevado (Figura 34), o EA das folhas de *Tynanthus micranthus*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/Kg, administrado por via oral, não reduziu o número de estiramento corporal [ $F(3,16) = 0,3293$ ;  $p = 0,8042$ ] e não aumentou o número de imersões de cabeça [ $F(3,16) = 0,6441$ ;  $p = 0,5979$ ] de forma significativa ( $p > 0,05$ ), quando comparado com o grupo controle. O tratamento com diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente o número de estiramento corporal [ $t(7) = 3,277$ ;  $p = 0,0135$ ], apresentando o efeito ansiolítico esperado, porém, não aumentou, de forma significativa ( $p > 0,05$ ), o número de imersões de cabeça [ $t(7) = 1,167$ ;  $p = 0,2813$ ], quando comparado com o grupo controle.

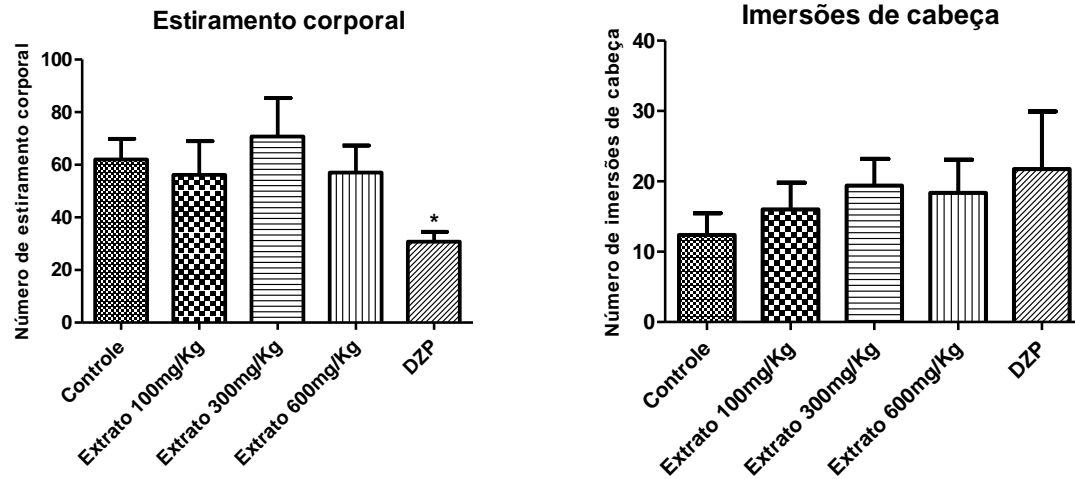
Para as avaliações etológicas do comportamento de auto-limpeza e de levantar, registradas no labirinto em cruz elevado (Figura 35), o EA das folhas de *Tynanthus micranthus*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/Kg, administrado por via oral, não reduziu de forma significativa ( $p > 0,05$ ) o comportamento de auto-limpeza [ $F(3,16) = 0,07647$ ;  $p = 0,9718$ ] quando comparado com o grupo controle. Para o comportamento de levantar, os resultados mostraram uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na análise de variância (ANOVA) [ $F(3,16) = 3,510$ ;  $p = 0,0397$ ], porém o teste *post-hoc* de Dunnett, demonstrou que os resultados não reduziram significativamente este comportamento quando comparado com o grupo controle. O tratamento com diazepam (DZP – 2,5 mg/kg,

v.o.) não reduziu de forma significativa ( $p > 0,05$ ) o comportamento de auto-limpeza [ $t(7) = 0,4627$ ;  $p = 0,6576$ ] e levantar [ $t(7) = 0,1665$ ;  $p = 0,8725$ ], quando comparado com o grupo controle.

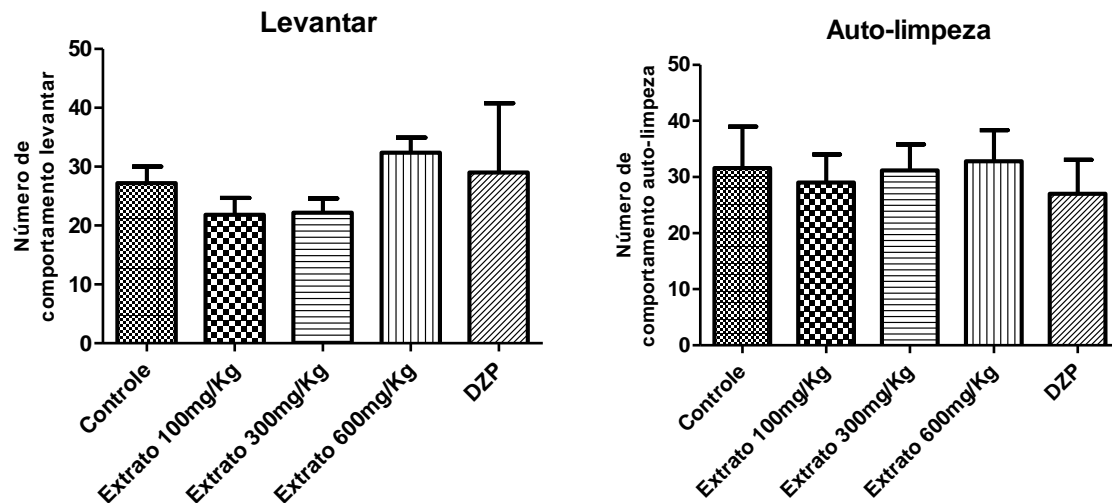
Em animais tratados com drogas ansiolíticas, como o diazepam, espera-se um aumento de entradas e tempo despendido nos braços abertos, com uma redução no comportamento de estiramento corporal e um aumento de imersões de cabeça.



**Figura 33** - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de *T. micranthus* (100- 600mg/kg) quanto às medidas comportamentais avaliadas em camundongos Swiss submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado: entradas e tempo despendido nos braços abertos, ambos expressos em porcentagem (%). O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg v.o.) foi utilizado como droga-padrão. N= 4-5 animais/grupo. Os dados estão representados como média  $\pm$  e.p.m. \* $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados da DZP).



**Figura 34** - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de *T. micranthus* (100- 600mg/kg) quanto às medidas comportamentais (avaliação etológica) avaliadas em camundongos Swiss submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado: número comportamentos de estiramento corporal e imersões de cabeça. O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg v.o.) foi utilizado como droga-padrão. N= 4-5 animais/grupo. Os dados estão representados como média ± e.p.m. \* $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados da DZP).



**Figura 35** - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de *T. micranthus* (100- 600mg/kg) quanto às medidas comportamentais (avaliação etológica) avaliadas em camundongos Swiss submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado: número de comportamentos de levantar e auto-limpeza. O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg v.o.) foi utilizado como droga-padrão. N= 4-5 animais/grupo. Os dados estão representados como média ± e.p.m. \* $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados da DZP).



#### 4.4.2 Teste do Campo Aberto

Os resultados referentes às medidas comportamentais registradas no campo aberto são apresentados nas Figuras 36, 37, 38 e 39.

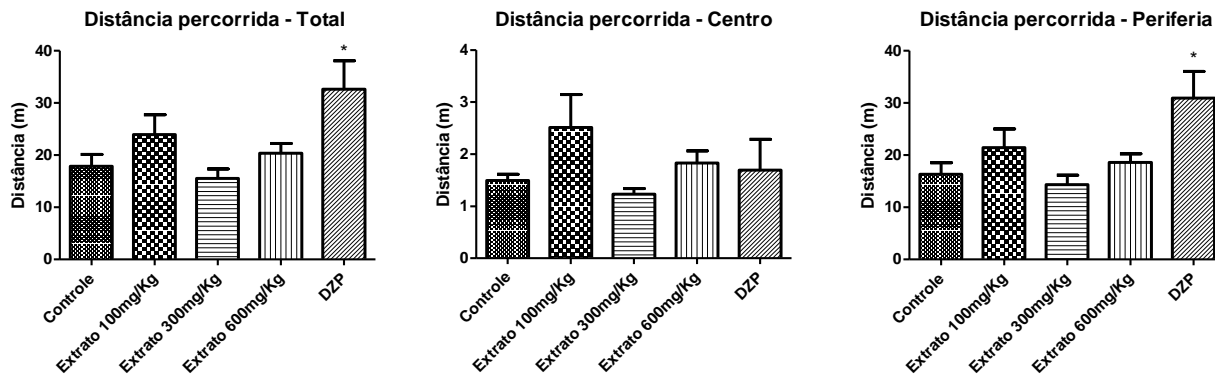
Como apresentado na Figura 36, o EA das folhas de *Tynanthus micranthus*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/Kg, administrado por via oral, não apresentou aumento significativo ( $p > 0,05$ ) para a distância percorrida em metros, total, centro e periferia [ $F(3,16) = 1,532$ ;  $p = 0,2447$ , [ $F(3,16) = 2,560$ ;  $p = 0,0914$  e  $F(3,16) = 1,956$ ;  $p = 0,1613$ , respectivamente], registradas no campo aberto, quando comparado com o grupo controle. O tratamento com diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o.) aumentou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a distância percorrida na periferia e total [ $t(8) = 2,601$ ;  $p = 0,0316$  e  $t(8) = 2,508$ ;  $p = 0,0365$ , respectivamente], porém não aumentou a distância percorrida no centro do campo aberto [ $t(8) = 0,3362$ ;  $p = 0,7453$ ], quando comparado ao grupo controle.

Como apresentado na Figura 37, o EA das folhas de *Tynanthus micranthus*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/Kg, administrado por via oral, não apresentou aumento significativo ( $p > 0,05$ ) para a velocidade média em metros por segundo, total, no centro e na periferia [ $F(3,16) = 1,919$ ;  $p = 0,1673$ , [ $F(3,16) = 2,923$ ;  $p = 0,0659$  e  $F(3,16) = 1,704$ ;  $p = 0,2063$ , respectivamente], registradas no campo aberto, quando comparado com o grupo controle. O tratamento com diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o.) aumentou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a velocidade média na periferia e total [ $t(8) = 2,655$ ;  $p = 0,0290$  e  $t(8) = 2,483$ ;  $p = 0,0380$ , respectivamente], porém não aumentou a velocidade média no centro do campo aberto [ $t(8) = 0,1395$ ;  $p = 0,2005$ ], quando comparado ao grupo controle.

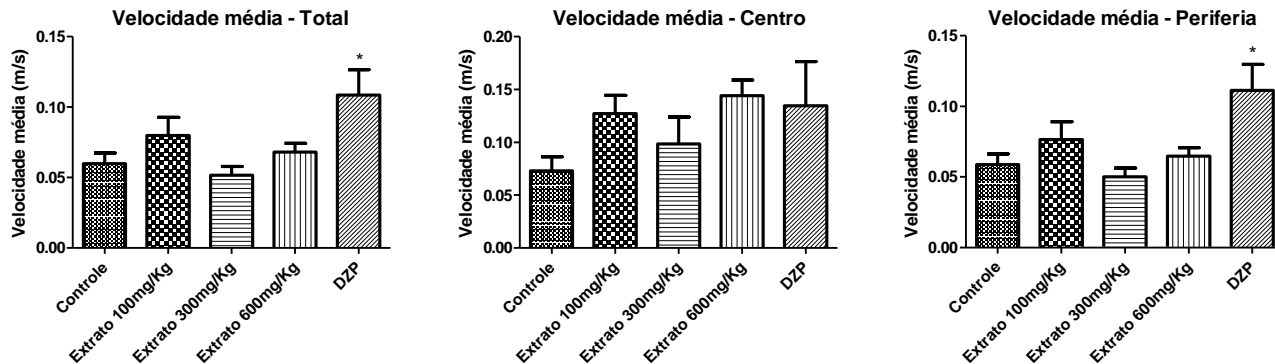
Como apresentado na Figura 38, o EA das folhas de *Tynanthus micranthus*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/Kg, administrado por via oral, não apresentou aumento significativo ( $p > 0,05$ ) no comportamento de auto-limpeza [ $F(3,16) = 0,2691$ ;  $p = 0,8467$ ] e no número de entradas no centro [ $F(3,16) = 1,626$ ;  $p = 0,2229$ ], e nem redução significativa ( $p > 0,05$ ) no comportamento de levantar [ $F(3,16) = 1,520$ ;  $p = 0,2475$ ], registrados no campo aberto, quando comparado com o grupo controle. O tratamento com diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o.) não aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) o comportamento de auto-limpeza [ $t(8) = 0,2417$ ;  $p = 0,8151$ ] e no número de entradas no centro [ $t(8) = 0,2517$ ;  $p = 0,8076$ ], e nem reduziu significativamente ( $p > 0,05$ ) o comportamento de levantar [ $t(8) = 0,1948$ ;  $p = 0,8504$ ], registrados no campo aberto, quando comparado com o grupo controle.

Como apresentado na Figura 39, o EA das folhas de *Tynanthus micranthus*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/Kg, administrado por via oral, não reduziu de forma significativa ( $p > 0,05$ ) o tempo de permanência na periferia e nem no centro do campo aberto [ $F(3,16) = 1,112$ ;  $p = 0,3735$  para ambas as medidas], quando comparado ao grupo controle. O tratamento com diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o.) não reduziu significativamente ( $p > 0,05$ ) o tempo de permanência no centro e periferia [ $t(8) = 0,2027$ ;  $p = 0,8444$  para ambas as medidas], quando comparado com o grupo controle.

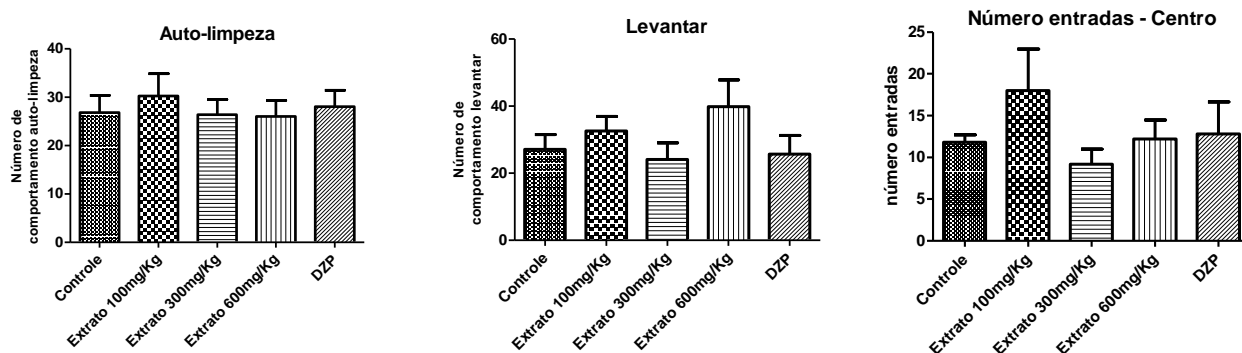
Quanto ao tempo em que os animais permanecem parados (imobilidade), o mesmo foi nulo para todos os grupos.



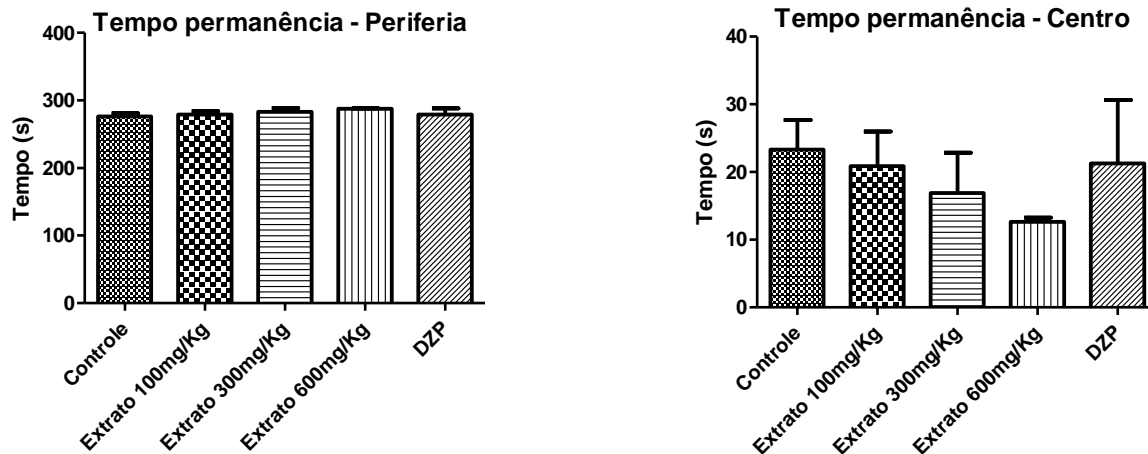
**Figura 36** - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de *T. micranthus* (100- 600mg/kg) quanto às medidas comportamentais avaliadas em camundongos Swiss submetidos ao teste do campo aberto: Distância percorrida em metros, total, no centro e na periferia. O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg v.o.) foi utilizado como droga-padrão. N= 5 animais/grupo. Os dados estão representados como média  $\pm$  e.p.m. \* $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados da DZP).



**Figura 37** - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de *T. micranthus* (100- 600mg/kg) quanto às medidas comportamentais avaliadas em camundongos Swiss submetidos ao teste do campo aberto: Velocidade média, em metros/segundo, total, no centro e na periferia. O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg v.o.) foi utilizado como droga-padrão. N= 5 animais/grupo. Os dados estão representados como média  $\pm$  e.p.m. \* $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados da DZP).



**Figura 38** - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de *T. micranthus* (100- 600mg/kg) quanto às medidas comportamentais avaliadas em camundongos Swiss submetidos ao teste do campo aberto: Número de comportamentos de auto-limpeza e levantar, e número de entradas no centro. O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg v.o.) foi utilizado como droga-padrão. N= 5 animais/grupo. Os dados estão representados como média  $\pm$  e.p.m. \* $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados da DZP).

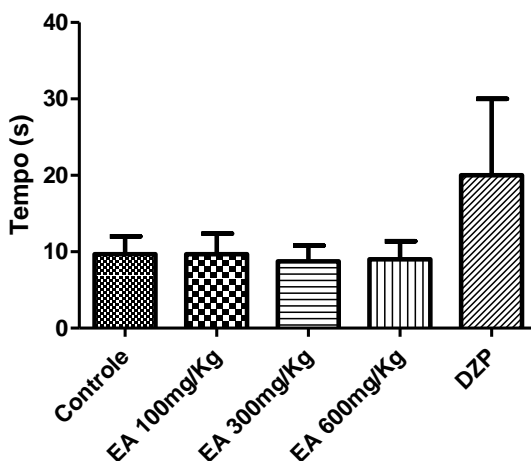


**Figura 39** - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de *T. micranthus* (100- 600mg/kg) quanto às medidas comportamentais avaliadas em camundongos Swiss submetidos ao teste do campo aberto: Tempo de permanência na periferia e centro. O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg v.o.) foi utilizado como droga-padrão. N= 5 animais/grupo. Os dados estão representados como média  $\pm$  e.p.m. \* $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados da DZP).

#### 4.4.3 Teste da Chaminé

Como apresentado na Figura 40, o EA das folhas de *Tynanthus micranthus*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/Kg, administrado por via oral, não aumentou de forma significativa ( $p > 0,05$ ) o tempo para alcançar a marca da chaminé, movendo-se de marcha-ré [F(3,10)= 0,03865;  $p=0,9892$ ], quando comparado com o grupo controle. O tratamento com diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o.), droga sedativa padrão, também não aumentou significativamente ( $p > 0,05$ ) o tempo para alcançar a marca da chaminé [ $t(3)= 1,285$ ;  $p= 0,2889$ ], quando comparado com o grupo controle.

Durante a realização deste teste, dentre os animais analisados, os que não desempenharam essa tarefa no tempo de 30 s foram considerados com prejuízo na sua coordenação motora, conforme representado na Tabela 14.



**Figura 40** - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de *T. micranthus* (100 - 600mg/kg) no teste da chaminé. O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg v.o.) foi utilizado como droga-padrão. N=5 animais/grupo. Os dados estão representados como média ± e.p.m. \* $p < 0,05$  contra o grupo controle (ANOVA seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP).

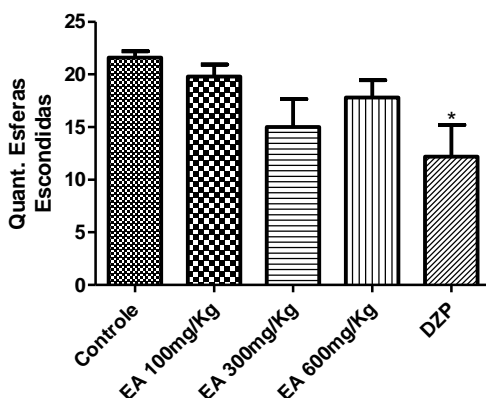
**Tabela 14** - Número de animais tratados via oral com o EA das folhas de *T. micranthus* (100, 300 e 600mg/kg) que foram considerados com prejuízo motor após serem submetidos ao teste da chaminé.

Grupo	Controle	EA 100 mg/Kg	EA 300 mg/Kg	EA 600 mg/Kg	DZP
Quantidade animais com prejuízo motor	2/5	2/5	1/5	1/5	3/5

#### 4.4.4 Teste de Esconder Esferas

Como apresentado na Figura 41, o EA das folhas de *Tynanthus micranthus*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/Kg, administrado por via oral, não reduziu de forma significativa ( $p > 0,05$ ) a quantidade de esferas de vidro escondidas com serragem pelos camundongos Swiss [ $F(3,16) = 2,776$ ;  $p = 0,0751$ ], quando comparado com o grupo controle.

O tratamento com diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o.) reduziu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a quantidade de esferas de vidro escondidas com serragem pelos camundongos Swiss [ $t(8) = 3,082$ ;  $p = 0,0151$ ], quando comparado com o grupo controle, conforme o comportamento ansiolítico esperado de um composto benzodiazepínico.



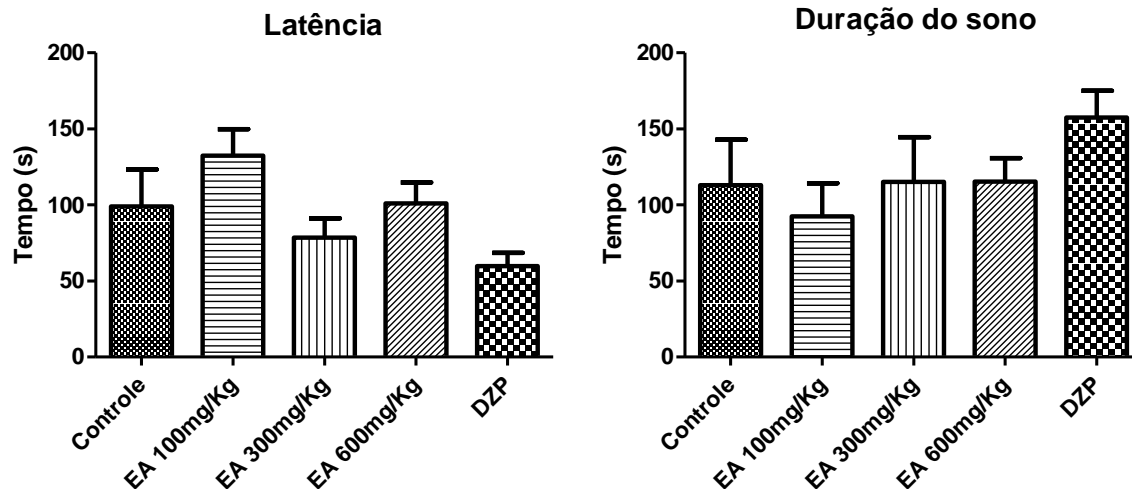
**Figura 41** - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de *T. micranthus* (100 - 600mg/kg) no teste de esconder esferas. O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg v.o.) foi utilizado como droga-padrão. N=5 animais/grupo. Os dados estão representados como média ± e.p.m. \* $p < 0,05$  contra o grupo controle (ANOVA seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP).



#### 4.4.5 Sono Induzido por éter etílico

Como apresentado na Figura 42, o EA das folhas de *Tynanthus micranthus*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/Kg, administrado por via oral, não reduziu de forma significativa ( $p > 0,05$ ) o tempo de latência [ $F(3,17) = 1,579$ ;  $p = 0,6318$ ], e nem aumentou de forma significativa ( $p > 0,05$ ) a duração do sono [ $F(3,17) = 1,275$ ;  $p = 0,2382$ ] no teste sono induzido por éter etílico, quando comparado com o grupo controle.

O tratamento com diazepam (DZP – 1,0 mg/kg, v.o.) não reduziu significativamente ( $p > 0,05$ ) o tempo de latência [ $t(8) = 1,519$ ;  $p = 0,1671$ ] e nem aumentou de forma significativa ( $p > 0,05$ ) a duração do sono [ $t(8) = 1,275$ ;  $p = 0,2382$ ] no teste de sono induzido por éter etílico, quando comparado com o grupo controle.



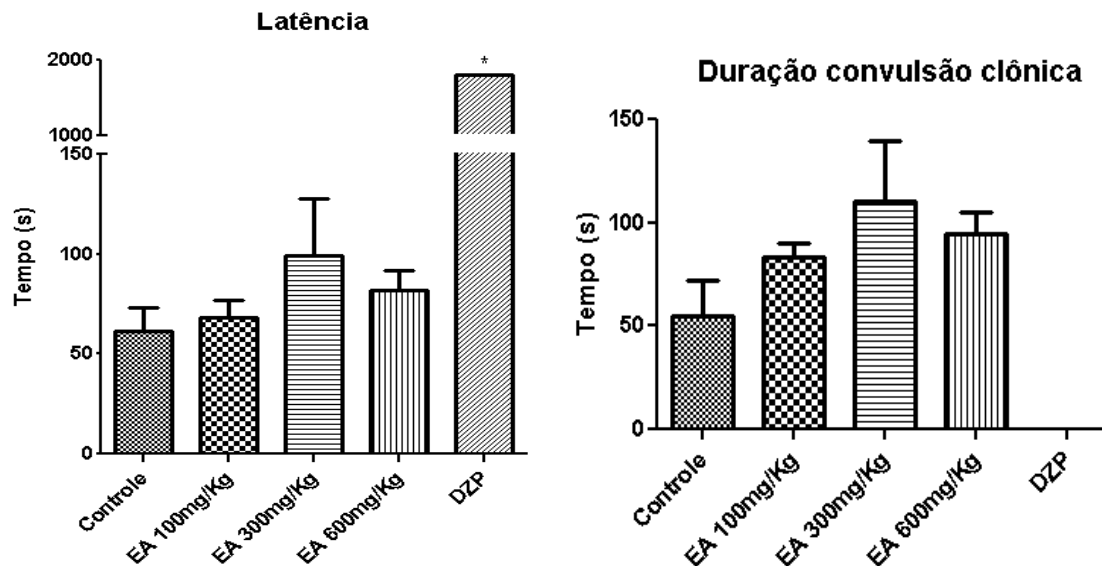
**Figura 42** - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de *T. micranthus* (100- 600mg/kg) na latência e na duração do sono em camundongos Swiss submetidos ao teste de sono induzido por éter etílico. O diazepam (DZP – 1,0 mg/kg v.o.) foi utilizado como droga-padrão. N= 5-6 animais/grupo. Os dados estão representados como média  $\pm$  e.p.m. \* $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados da DZP)

#### 4.4.6 Convulsões induzidas por Pentilenotetrazol

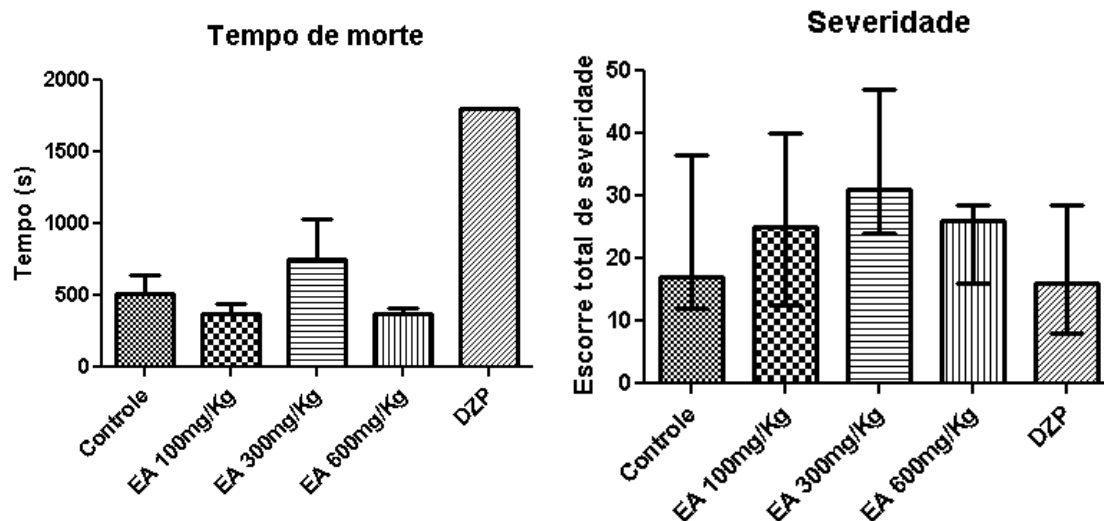
Os resultados referentes aos parâmetros avaliados no teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol são apresentados nas Figuras 43 e 44.

Como apresentado na Figura 43, o EA das folhas de *Tynanthus micranthus*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/Kg, administrado por via oral, não apresentou aumento significativo ( $p > 0,05$ ) para o tempo de latência da primeira convulsão clônica [ $F(3,16) = 0,9756$ ;  $p = 0,4287$ ], e nem reduziu significativamente ( $p > 0,05$ ) a duração da primeira convulsão clônica [ $F(3,16) = 1,632$ ;  $p = 0,2216$ ], quando comparado com o grupo controle. O tratamento com diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o.) aumentou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o tempo de latência para a primeira convulsão clônica [ $t(4) = 152,4$ ;  $p < 0,00001$ ], quando comparado com o grupo controle. Os animais tratados com a droga anticonvulsivante padrão (diazepam) para convulsões induzidas por PTZ, não apresentaram convulsão clônica durante o período de observação, conforme esperado para este tipo de composto.

Como apresentado na Figura 44, o EA das folhas de *Tynanthus micranthus*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/Kg, administrado por via oral, não apresentou aumento significativo ( $p > 0,05$ ) para o tempo de morte [ $F(3,16) = 1,245$ ;  $p = 0,3262$ ], e nem reduziu significativamente ( $p > 0,05$ ) a severidade das convulsões induzidas por PTZ [ $H(4) = 2,949$ ;  $p = 0,3996$ ], quando comparado com o grupo controle. O tratamento com diazepam (DZP – 2,5 mg/kg, v.o.) não reduziu de forma significativa ( $p > 0,05$ ) a severidade das convulsões induzidas por PTZ [ $U = 10,50$ ;  $p = 0,7533$ ], quando comparado com o grupo controle. Não ocorreu morte dos animais tratados com a droga anticonvulsivante padrão (diazepam) para convulsões induzidas por PTZ, durante o período de observação, conforme esperado.



**Figura 43** – Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de *T. micranthus* (100- 600mg/kg) na latência e duração da primeira convulsão clônica em camundongos Swiss submetidos ao teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol. O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg v.o.) foi utilizado como droga-padrão. N= 5 animais/grupo. Os dados estão representados como média  $\pm$  e.p.m. \* $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP).



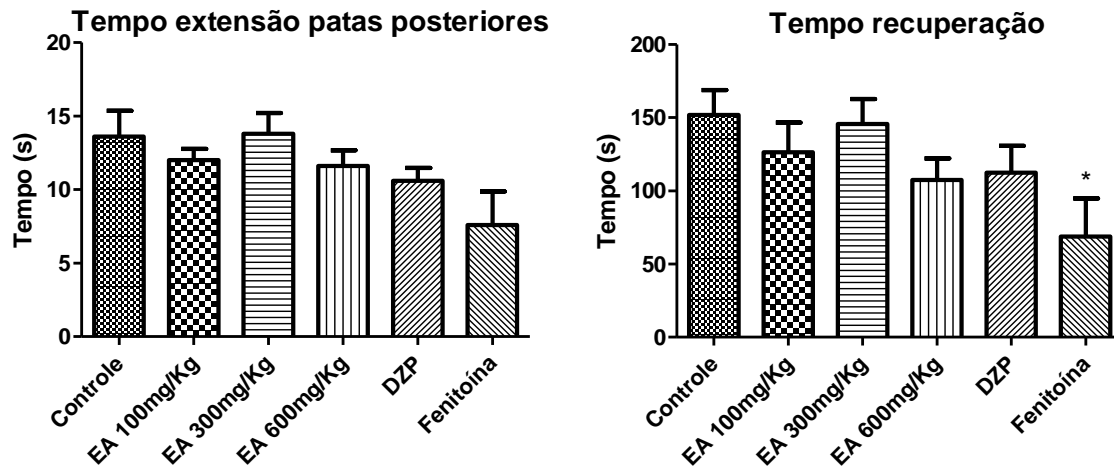
**Figura 44** - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de *T. micranthus* (100- 600mg/kg) no tempo de morte e severidade das convulsões em camundongos Swiss submetidos ao teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol. O diazepam (DZP – 2,5 mg/kg v.o.) foi utilizado como droga-padrão. N= 5 animais/grupo. Os dados estão representados no parâmetro tempo de morte como média ± e.p.m. \* $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP) e no parâmetro severidade das convulsões como mediana ± limite de confiança \* $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn; teste de Mann-Whitney para os dados do DZP).

#### 4.4.7 Convulsões induzidas por eletrochoque corneal

Como apresentado na Figura 45, o EA das folhas de *Tynanthus micranthus*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/Kg, administrado por via oral, não reduziu significativamente ( $p>0,05$ ) o tempo de extensão das patas posteriores [ $F(3,16)=0,7107$ ;  $p=0,5597$ ] e nem o tempo de recuperação no teste de convulsões induzidas por eletrochoque corneal [ $F(3,16)= 1,035$ ;  $p= 0,4096$ ], quando comparado com o grupo controle.

O tratamento com fenitoína (20 mg/kg i.p.), anticonvulsivante padrão para convulsões induzidas por eletrochoque corneal, reduziu significativamente ( $p<0,05$ ) o tempo de recuperação [ $t(8)= 2,672$ ;  $p=0,0283$ ], conforme esperado, mas não reduziu significativamente ( $p>0,05$ ) o tempo de extensão das patas posteriores [ $t(8)= 2,068$ ;  $p= 0,0725$ ], quando comparado com o grupo controle. O tratamento com diazepam (DZP – 2,5 mg/kg v.o.), não reduziu significativamente ( $p>0,05$ ) o tempo de recuperação e nem o tempo de extensão das patas posteriores [ $t(8)= 1,569$ ;  $p= 0,1553$  e  $t(8)= 1,515$ ;  $p= 0,1682$ , respectivamente], quando comparado com o grupo controle, conforme esperado.

O EA das folhas de *Tynanthus micranthus*, nas doses de 300 e 600 mg/Kg, administrado por via oral, apresentaram taxa de letalidade de 20 e 40%. Para os demais grupos, a taxa de letalidade foi nula.



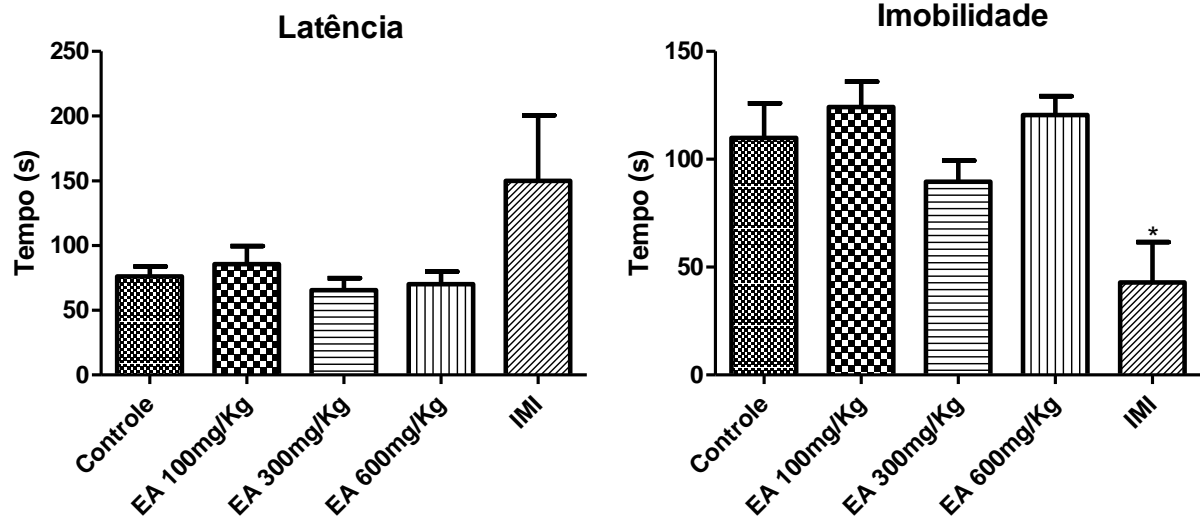
**Figura 45** - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de *T. micranthus* (100- 600mg/kg) no tempo de extensão das patas posteriores e tempo de recuperação das convulsões em camundongos Swiss submetidos ao teste de convulsões induzidas por Eletrochoque corneal. A fenitoína (20 mg/Kg i.p.) foi utilizada como droga-padrão. Utilizou-se diazepam (DZP – 2,5 mg/Kg, v.o.) para comparação com o grupo controle. N= 5 animais/grupo. Os dados estão representados como média  $\pm$  e.p.m. \* $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados da fenitoína e DZP)

#### 4.4.8 Teste de suspensão pela cauda

Como apresentado na Figura 46, o EA das folhas de *Tynanthus micranthus*, nas doses de 100, 300 e 600 mg/Kg, administrado por via oral na forma de tratamento agudo, não aumentou significativamente ( $p>0,05$ ) o tempo de latência para o primeiro comportamento de imobilidade [ $F(3,16)= 0,7250$ ;  $p= 0,5517$ ], e nem reduziu de forma significativa ( $p>0,05$ ) a duração da imobilidade no teste de suspensão pela cauda [ $F(3,16)= 1,682$ ;  $p= 0,2109$ ], quando comparado com o grupo controle.

O tratamento agudo com imipramina (IMI - 45 mg/kg v.o.), droga antidepressiva padrão, reduziu significativamente ( $p<0,05$ ) o tempo de imobilidade [ $t(7)= 2,718$ ;  $p=0,0299$ ], conforme o esperado, mas não aumentou significativamente ( $p>0,05$ ) o tempo de latência para o primeiro comportamento de imobilidade [ $t(7)= 1,625$ ;  $p= 0,1482$ ] no teste de suspensão pela cauda, quando comparado com o grupo controle.





**Figura 46** - Efeitos do tratamento oral com o EA das folhas de *T. micranthus* (100- 600mg/kg) na latência e no tempo de imobilidade em camundongos Swiss submetidos ao teste da suspensão pela cauda. A imipramina (IMI - 45 mg/kg v.o.) foi utilizada como droga-padrão. N= 4-5 animais/grupo. Os dados estão representados como média  $\pm$  e.p.m. \* $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida por teste de Dunnett; teste “t” de Student não pareado foi utilizado para os dados da IMI).

#### 4.5 Cálculo de custos do projeto

Como apresentado na Tabela 16, as atividades realizadas no presente trabalho totalizaram custo de R\$ 4.233,73.

Como observado na Figura 41, a etapa que apresentou maior peso no valor de custo foi a de Ensaio Farmacológico (42%), envolvendo os testes para a avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva. Por outro lado, a que apresentou menor custo foi a de manutenção do extrato liofilizado em freezer, do momento em que foi produzido até ser utilizado para os experimentos (3%).

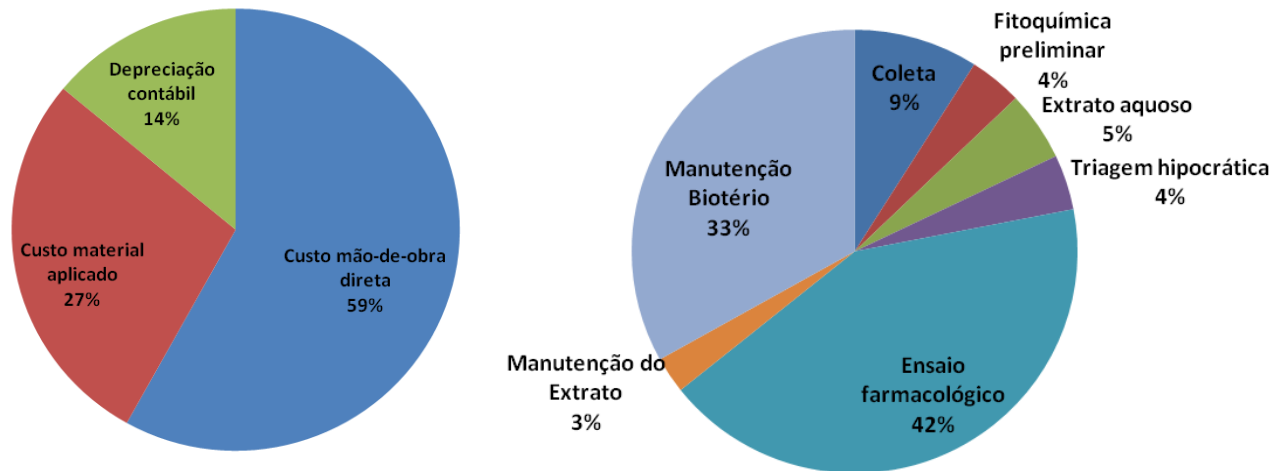
Os testes realizados classificados como Ensaio Farmacológico, foram realizados em batereria, com a finalidade de se reduzir custos e quantidade de animais utilizados para os testes. Os testes foram divididos em quatro baterias, sendo realizadas da seguinte forma:

1. Teste hipocrático;
2. Teste labirinto em cruz elevado + campo aberto + teste da chaminé + convulsão induzida por PTZ;
3. Sono induzido por éter etílico;
4. Teste de Esconder esferas + convulsão induzida por eletrochoque corneal;
5. Teste de Suspensão pela cauda;

Nesta mesma figura, é possível observar que a maior parte dos custos envolvidos estão relacionados com o custo de mão-de-obra direta (59%). É importante ressaltar entre os custos apresentados não foi incluso os custos com mão-de-obra especializada para a criação dos animais até o momento de seu uso, assim como os custos estruturais e administrativos do biotério (luz, água, vacinas, tratamentos antiparasitários, desgaste dos equipamentos de refrigeração da sala, entre outros).

**Tabela 15** – Custos de mão-de-obra, material aplicado e depreciação contábil referente a cada etapa de atividades realizadas para a avaliação preliminar do EA de *Tynanthus micranthus*.

NÍVEL / ETAPA	CUSTO MÃO-DE-OBRA DIRETA	CUSTO MATERIAL APLICADO	DEPRECIÇÃO CONTÁBIL	TOTAL
<b>Nível I</b>				
Coleta	R\$ 299,46	R\$ 81,91	R\$ 0,33	R\$ 381,70
Fitoquímica preliminar	R\$ 155,53	R\$ 4,74	R\$ 2,30	R\$ 162,56
Extrato aquoso	R\$ 196,42	R\$ 0,29	R\$ 17,96	R\$ 214,67
<b>Nível II</b>				
Triagem hipocrática	R\$ 69,23	R\$ 100,93	R\$ 0,02	R\$ 160,82
Ensaio farmacológico	R\$ 1.144,71	R\$ 646,14	R\$ 0,34	R\$ 1.736,07
<b>Manutenção Extrato</b>	R\$ 1,61	R\$ 0,00	R\$ 110,96	R\$ 112,57
<b>Manutenção Biotério</b>	R\$ 592,48	R\$ 347,73	R\$ 460,66	R\$ 1.400,87
<b>TOTAL</b>	<b>R\$ 2.459,44</b>	<b>R\$ 1.181,73</b>	<b>R\$ 592,56</b>	<b>R\$ 4.233,73</b>



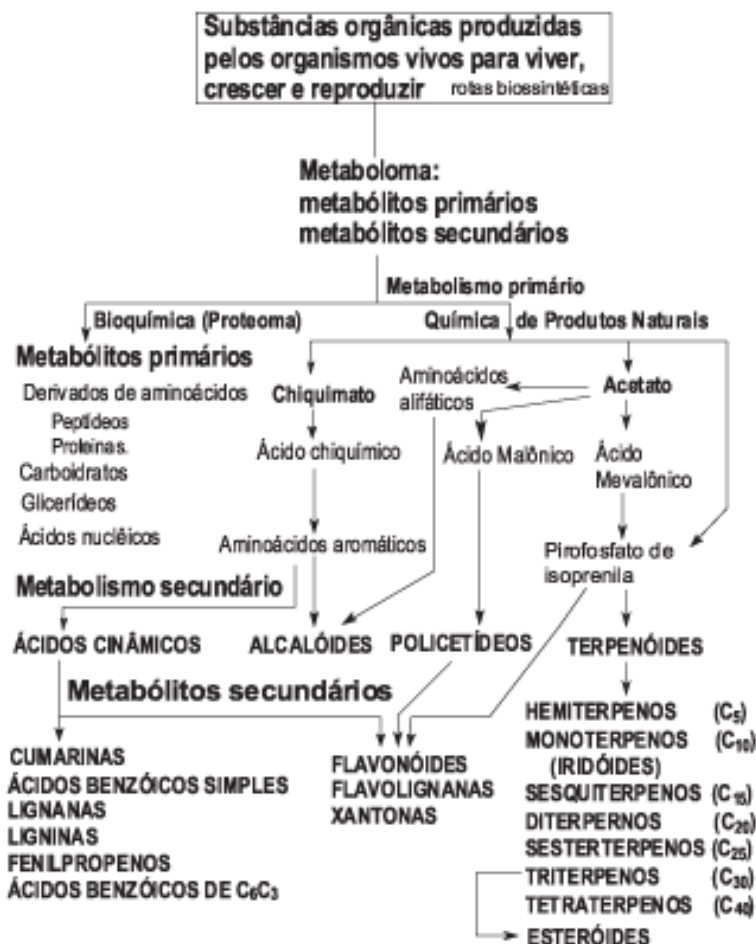
**Figura 47** – Representação, em porcentagem, o peso de (esquerda) cada categoria de custo e de (direita) cada etapa no valor de custo total das atividades realizadas.

## 5 DISCUSSÃO

Produtos naturais têm servido de inspiração para o desenvolvimento de vários produtos pela química orgânica nos últimos tempos. A avaliação de extratos, e de compostos derivados de plantas, que apresentem atividade promissora, servem como um caminho para o avanço de metodologias de síntese e a possibilidade de fabricação de análogos do composto original, melhorando seus aspectos farmacológicos e farmacêuticos (HARVEY, 2008), buscando sempre uma maior eficácia e menos efeitos adversos. Na última década, houve um aumento significativo na busca de novos agentes terapêuticos originados de plantas medicinais para doenças psiquiátricas (ZHANG, 2004).

A pesquisa fitoquímica é uma ferramenta importante quando se deseja conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença. Em casos onde não se tem estudos químicos sobre a espécie em interesse ou estes são restritos, a análise fitoquímica preliminar pode indicar a presença de grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma. Porém quando o interesse é restrito a uma classe específica de constituintes ou a alguns compostos isolados, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural das mesmas (SIMÕES et al., 2007).

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, da qual se originam dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato, como pode ser visualizado na Figura 48. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. É importante ressaltar que as rotas metabólicas dos metabólitos secundários podem ser ativadas durante alguns estágios particulares de crescimento e desenvolvimento ou em períodos de estresse causados por limitações nutricionais ou ataque microbiológico (BRAZ FILHO, 2010; SIMÕES et al., 2007).



**Figura 48** - Substâncias naturais produzidas pelo metabolismo primário e secundário.

Fonte: BRAZ FILHO, 2010.

Informações na literatura para a família *Tynanthus* são restritas. As espécies *Tynanthus fasciculatus* e *Tynanthus panurensis* são as que apresentam maior quantidade de informações quanto à composição química e atividade farmacológica estudadas.

Em trabalhos realizados com a espécie *Tynanthus fasciculatus* Miers, observou-se a presença de açúcares redutores, heterosídeos car-

dietônicos, saponinas, triterpenos e esteróides, compostos fenólicos, taninos, flavonóides (CARVALHO et al., 2009; VILEGAS et al., 1993) e alcalóides no caule (NASCIMENTO, 2008), além de cumarinas, fenilpropanóides e esteróides nos ramos, folhas, raízes e casca da raiz (VILEGAS et al., 1993).

Estudos relacionados à extração, isolamento e identificação de compostos, resultou no conhecimento dos compostos  $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glicosídeo (VILEGAS et al., 1993), o ácido melilótico e seus derivados (VILEGAS et al., 1994) e eugenol no óleo essencial (BURGO et al., 2006), todos originados da espécie *Tynanthus fasciculatus* Miers.

A análise fitoquímica do extrato metanólico da casca de *Tynanthus panurensis*, levou ao isolamento e identificação de um novo glicosídeo fenilpropanóide, o eugenol-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 5)-O- $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo], verbascosídeo, leucosceptosídeo e isoverbascosídeo e ao flavonóide katchimosídeo (apigenina 8-C-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo]). O derivado eugenol foi o glicosídeo fenilpropanóide encontrado em maior concentração (PLAZA et al., 2005).

Para a espécie *Tynanthus micranthus*, a quantidade de informações referente à análise fitoquímica é ainda mais restrita. No trabalho realizado por Cansian (2010), avaliou-se a presença de grupos de metabólitos secundários em diferentes extratos (H - hexano, C - clorofórmio, AE - acetato de etila e HA – hidroalcoólica) de raiz (R), caule (C) e folha (F) da espécie vegetal *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo ex K. Schum. O trabalho demonstra a presença de leucoantocianidinas nos extratos CR, AER, HAR e HAF; heterosídeos flavônicos nos extratos CR, AER, HAR, CC, AEC, HAC, CF, AEF e HAF; heterosídeos antraquinônicos nos extratos HAC e HAF, e esteróides e/ou triptenos nos extratos HR, CR, HC, CC e HF.

Além disso, estudos revelam a presença de alguns compostos isolados, entre eles um hidrocarboneto de cadeia longa, com estrutura não completamente elucidada, a flavona apigenina e o esteróide  $\beta$ -sitosterol. No óleo volátil extraído das folhas de *Tynanthus micranthus* foram identificados os compostos O-decil-hidroxilamina, hexadecametil-ciclooctasiloxane, éster butil, éster com butil glicolato, metilhexadecanoato, ácido 1,2 benzenodicarboxílico, butil 2-etilhexil éster, ácido hexadecanóico (ácido palmítico), pentadecanal, ciclodecasiloxane, eicosametil, 5-dodeciloctanol-2-ona e ácido oléico (CANSIAN, 2010).

A análise fitoquímica realizada em nosso trabalho mostrou a presença de cumarinas voláteis, polifenóis, taninos, catequinas, flavonóides e saponinas nas folhas da planta *Tynanthus micranthus* Corr.

Méllo ex K. Schum. A presença de destes grupos de metabólitos secundários foram confirmados pela literatura como compostos presentes em diversas espécies deste gênero. A única exceção é para as catequinas, onde não se encontrou relatos da presença deste grupo neste gênero.

Esta variação nos resultados quanto à presença de grupos de metabólitos secundários pode ser relacionada com os diversos fatores que interferem na quantidade e até mesmo na natureza dos constituintes ativos. Os fatores que influenciam na produção de metabólitos secundários pelas espécies vegetais são: sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes (macromoléculas e micromoléculas), poluição atmosférica, altitude e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; SIMÕES et al., 2007).

Por outro lado, com o avanço nas pesquisas referentes à constituição química das plantas que apresentam atividade ansiolítica e antidepressiva, torna-se mais fácil investigar os compostos presentes em cada planta e que possam estar envolvidos nestas atividades. Além disso, estes compostos passam a ser fortes candidatos para futuras investigações, que poderão resultar em novos produtos para a prática clínica. Alguns compostos foram identificados como agentes ansiolíticos (honoikiol, magnolol, flavonóides, kavalactonas e glicowitanolideos) e como agentes antidepressivos (oligossacarídeos MW-97, ácido rosmarinico, ácido cafeico e apigenina) (ZHANG, 2004).

Apesar do avanço que encontramos na pesquisa de investigação de atividades farmacológicas e descobertas de novos compostos, ainda encontramos dificuldade em validarmos plantas que são utilizadas popularmente há anos para determinadas patologias. O que pode explicar esse tipo de ação ainda é desconhecido. A variação na constituição e concentração dos princípios ativos presentes na planta, devido aos fatores abordados, forma de preparo do produto para ser administrado (podendo resultar em variações na concentração e presença de compostos), tratamento (via de administração, concentração e posologia) da planta a ser estudada, entre outros, que interferem de forma direta nos resultados obtidos. Com isso, é possível ocorrer divergência nos resultados apresentados entre literaturas que demonstram estudos sobre uma mesma espécie vegetal. Sabe-se também que o efeito sinérgico entre compostos de uma mesma planta acontece e é de extrema importância na obtenção da resposta terapêutica na maioria dos casos (SARRIS, 2007; WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

As ações farmacológicas de plantas medicinais envolvem, na sua maioria, muitos constituintes relacionados a vários mecanismos



conhecidos. Um exemplo é a capacidade que vários constituintes com atividade ansiolítica apresentam de aumentar a função do complexo receptor GABAA/BZD central. Caso semelhante ocorre com muitos constituintes ativos antidepressivos que inibem a atividade da MAO e modulam a neurotransmissão monoaminérgica (ZHANG, 2004). Trata-se do efeito sinérgico entre os compostos. Isto possibilita que esses compostos utilizados em pequenas concentrações exerçam efeito maior quando comparados ao efeito apresentado utilizando-se apenas um deles (SARRIS, 2007; WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

Um exemplo é a berberina, que está presente em diversas plantas (*Hydrastis canadensis*, *Coptis chinensis*, *Berberis aquifolium*, *Berberis vulgaris*, *Berberis thunbergii* e principalmente *Berberis aristata*), estudada como uma alternativa para o tratamento de diversas patologias relacionadas ao SNC. Para a depressão, comprovou-se sua atividade como antidepressivo, com o seu efeito potencializado quando usado em combinação com desipramina (inibidor da recaptação de norepinefrina), fluoxetina (SSRI) e moclobemida (inibidor da MAO), porém não apresentando este efeito potencializador com maprotilina (inibidor seletivo da dopamina). O mesmo ocorre com a sua atividade ansiolítica que é potencializada com o uso de buspirona, um antagonista do receptor de serotonina ou ritanserina, um antagonista do receptor de serotonina do tipo 5-HT<sub>2</sub> (KULKARNI; DHIR, 2010).

Na avaliação do potencial terapêutico de produtos à base de plantas, relacionadas à atividade no Sistema Nervoso Central, é utilizada uma variedade de modelos ou testes animais, facilitando na investigação de mecanismos de ação por meio de abordagens neuroquímicas (ZHANG, 2004). Modelos ou testes animais apresentam inúmeras vantagens como, por exemplo, a possibilidade de se controlar condições ambientais e monitorar o estado de saúde dos animais utilizados no experimento (VAN DER STAAY, 2004), além de uma resposta mais rápida acerca do mecanismo de ação dos fármacos (BOURIN et al., 2007). Para a avaliação pré-clínica de uma planta com atividade promissora, ansiolítica ou antidepressiva, por exemplo, são utilizados diferentes testes animais para cada atividade.

Dentre os testes animais para avaliar a atividade ansiolítica de compostos em ratos ou camundongos, o labirinto de cruz elevado tem sido frequentemente utilizado. Além deste, realiza-se também o teste de campo aberto, teste de exploração na caixa claro/escuro (que são procedimentos não condicionados, baseados no comportamento natural dos animais, que tendem a explorar ambientes novos), teste de conflito de Vogel, teste de quatro placas e o sobressalto potencializado pelo medo

(que são procedimentos condicionados, no qual estímulos aversivos são associados ao ambiente novo), entre outros. Como controle positivo nestes testes sugere-se a utilização de benzodiazepínicos típicos, como o lorazepam e o diazepam (BOURIN et al., 2007; ZHANG, 2004).

Segundo Bourin e colaboradores (2007), muitos dos testes são baseados na farmacologia dos benzodiazepínicos, tornando a sua sensibilidade questionável para drogas que agem em outros sistemas. Sendo assim, sugere-se a realização de testes para a avaliação da atividade ansiolítica e testes complementares, avaliando a atividade locomotora, hipnosedativa e anticonvulsivante, a fim de se evitar resultados falso-positivos (RODGERS; DALVI, 1997).

Desta forma, um dos testes realizados para avaliar a atividade ansiolítica foi o labirinto em cruz elevado. O LCE é um dos testes animais mais utilizados no estudo das bases neurobiológicas da ansiedade experimental e é uma ferramenta bastante importante na busca de novas moléculas bioativas com potencial atividade ansiolítica (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005), pois permite um rápido *screening* de drogas moduladoras da ansiedade sem treinamento ou a participação de modelos complexos. Este teste é baseado na aversão natural de roedores para espaços abertos e usa o conflito entre a exploração e aversão a este tipo de lugar. Os perfis de comportamento provocados no LCE são semelhantes aos de neofobia, exploração e a aproximação/evitar conflitos, assim, o aparelho é muitas vezes referido como um modelo de conflito comportamental espontâneo não-condicionado (BOURIN et al., 2007).

Os parâmetros comportamentais no LCE estão relacionados a dois fatores independentes, a ansiedade e a atividade motora. A porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos são boas medidas para a avaliação da ansiedade gerada pelo teste. Além disso, esse teste oferece uma série de vantagens quando comparados aos outros modelos utilizados para avaliar a ansiedade que envolve a privação de alimento ou água ou a administração de choque (BOURIN et al., 2007).

Nossos resultados mostraram que o tratamento agudo com EA de *Tynanthus micranthus* não aumentou o número de entradas e nem o tempo de permanência nos braços abertos, de forma significativa, quando comparado com o grupo controle. Esta falta de efeito ansiolítico pode ser devida ao uso de grupos pequenos de animais (N= 4-5 animais/grupo), e deve ser melhor investigada. Quanto aos comportamentos etológicos avaliados, não foi observado redução no comportamento de estiramento corporal e auto-limpeza, e nem aumento de imersões de cabeça, de forma significativa quando comparado com o grupo controle.

O aumento do comportamento de estiramento corporal de forma significativa ( $p < 0,05$ ) para o grupo tratado com diazepam, droga ansiolítica padrão, quando comparado com o grupo controle, possibilita confiabilidade dos resultados obtidos, uma vez que se trata de um comportamento ansiolítico característico. Além disso, percebe-se uma tendência de aumento na exploração do LCE deste grupo, ao avaliar os demais parâmetros, sendo que não foi possível obter uma diferença significativa para estes devido à grande variância dos resultados.

Através de uma extrapolação dos dados, aumentando-se o número de animais por grupo (devido ao grande erro apresentado), porém mantendo-se a média dos dados obtidos, observou-se que ocorre uma tendência para o efeito ansiolítico do EA de *Tynanthus micranthus*, na concentração de 100 mg/kg, administrado por via oral. O mesmo ocorre para o grupo tratado com ansiolítico (diazepam), onde se observa uma tendência de aumento da exploração do LCE, conforme o desejado. Desta forma, acredita-se que a repetição deste teste, porém com uma quantidade maior de animais ( $N = 9$  animais/grupo), seria possível reduzir a variação dos resultados levando talvez à uma significância estatística.

Outro teste realizado é o do campo aberto. Este teste possibilita a avaliação de efeitos estimulantes ou sedativos de um determinado composto ou extrato. Através da avaliação de diversos parâmetros, avaliamos a atividade ansiolítica e locomotora.

Nossos resultados mostraram que o tratamento agudo com EA de *Tynanthus micranthus* não aumentou de forma significativa ( $p > 0,05$ ) a distância percorrida (m) total, no centro e na periferia, a velocidade média (m/s) total, no centro e na periferia, o número de entradas no centro, e nem reduziu o tempo de permanência na periferia e no centro do campo aberto, quando comparado com o grupo controle. No que se refere ao comportamento etológico, o tratamento com o EA de *Tynanthus micranthus*, não aumentou o comportamento de auto-limpeza e nem reduziu o comportamento de levantar, de forma significativa ( $p > 0,05$ ), quando comparado com o grupo controle.

Os nossos resultados também mostraram que a movimentação dos animais durante o teste de campo-aberto foi constante, não ocorrendo tempo de imobilidade. Este parâmetro, juntamente com os acima citados, permite observar que a atividade locomotora não foi afetada nos animais tratados com o EA de *Tynanthus micranthus*, quando comparado ao grupo controle.

O aumento da distância percorrida e da velocidade média (total e periférica) de forma significativa ( $p < 0,05$ ) para o grupo tratado com

diazepam, droga ansiolítica padrão, traz confiabilidade dos resultados obtidos.

Novamente, através de uma extrapolação dos dados, aumentando-se o número de animais por grupo (devido ao grande erro apresentado), porém mantendo-se a média dos dados obtidos, observou-se que ocorre uma tendência para o efeito ansiolítico do EA de *Tynanthus micranthus*, na concentração de 100 mg/kg, administrado por via oral, principalmente para os parâmetros de distância percorrida, velocidade média e número de entradas no centro. Assim, acredita-se que a repetição deste teste, porém com uma quantidade maior de animais ( $N=9$  animais/grupo), da mesma forma que no LCE, seria possível reduzir a variação dos resultados levando a significância estatística.

Com a finalidade de auxiliar na avaliação da atividade de coordenação motora, realizou-se o teste da chaminé. Trata-se de um teste simples de ser realizado e que permite uma rápida observação de prejuízo motor de um determinado composto ou extrato.

Os nossos resultados demonstraram que não houve aumento significativo ( $p>0,05$ ) no tempo necessário para alcançar a marca da chaminé, movendo-se de marcha-ré, dos animais tratados com EA de *Tynanthus micranthus*, que conseguiram realizar a tarefa, quando comparado ao grupo controle. Apesar da visualização de um aumento na média do tempo necessário para alcançar a marca da chaminé por parte dos animais tratados com o diazepam, ele não foi significativo ( $p>0,05$ ) quando comparado com o grupo controle.

Mesmo o teste da chaminé sendo um teste simples e rápido de ser realizado, encontrou-se dificuldade durante o experimento, que tornam os resultados obtidos duvidosos. Ocorreu um aumento na micção da maioria dos animais no momento em que eles se direcionavam para a extremidade oposta do tubo de vidro simples, quando na posição horizontal. Isto fez com que o mesmo ficasse escorregadio ao ser colocado o tubo na posição vertical, dificultando a subida de marcha-ré por parte dos animais. Assim, eles encontraram dificuldades para atingir a marca alcançada dentro do tempo estipulado de 30 s.

Segundo a literatura, os animais que não desempenham essa tarefa no período de 30 s, são considerados com prejuízo da sua coordenação motora (COLETA et al., 2006; GRÖTICKE et al., 2007; LAPA et al., 2008). Apesar dos nossos resultados terem demonstrado que vários animais não conseguiram desempenhar essa tarefa no tempo estipulado, os resultados obtidos no teste de campo-aberto, indicam que o tratamento com o EA não diminui a coordenação motora dos animais. Desta forma, sugere-se que para a avaliação da coordenação motora de forma

mais confiável, os animais tratados com o EA fossem submetidos a outros testes destinados para esta finalidade, como por exemplo, o rota-rod.

Em se tratando da avaliação de comportamentos ansiosos, em condições naturais ou em laboratórios, os ratos e camundongos apresentam o instinto de enterrar fontes desagradáveis presentes em seu ambiente. Este comportamento, que consiste em escavar a serragem por cima da fonte de aversão usando o focinho e as patas dianteiras a fim de evitar e se proteger da ameaça, é descrito como um comportamento defensivo refletindo o estado de ansiedade dos animais. O teste de esconder esferas tem sido utilizado como um modelo de *screening* para a detecção de ansiolíticos, porém com características específicas.

Diferente dos outros testes (LCE e campo aberto), nos casos em que é necessário o reteste, o resultado obtido não é alterado com a reexposição do animal ao teste. O fato de não ocorrer alteração nos resultados obtidos no teste e reteste, permite que este teste seja também utilizado para a avaliação de uma classificação de ansiedade mais específica, o de transtorno obsessivo compulsivo (TOC). Estudos sobre o comportamento dos camundongos evidenciaram que após terem sido expostos às esferas de vidro, eles exibem intensa atividade de esconder mesmo em sua ausência. Tal comportamento compulsivo contribui para sustentar a hipótese de que este modelo esteja relacionado com o TOC (GARGA-NO, 2007).

Sendo assim, para auxiliar na avaliação da atividade da atividade ansiolítica do EA, foi realizado o teste de esconder esferas, porém não foi realizado o reteste. Nossos resultados mostraram que o tratamento agudo com EA de *Tynanthus micranthus* não reduziu de forma significativa ( $p > 0,05$ ) a quantidade de esferas de vidro escondidas com serragem pelos camundongos no teste de esconder esferas, quando comparado com o grupo controle. Para o grupo tratado com a droga ansiolítica padrão, o diazepam, foi possível observar que houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na quantidade de esferas escondidas, quando comparado com o grupo controle, conforme o esperado, permitindo uma maior confiabilidade nos resultados obtidos.

Através de uma análise de tendência realizada pelo programa estatístico *GraphPad Prism 5.00.288*®, observou-se uma tendência nos resultados obtidos para a concentração de 300 mg/kg do EA, em reduzir o número de esferas escondidas, semelhante ao que ocorreu com o grupo tratado com DZP, quando comparado com o grupo controle. Esta tendência também foi confirmada realizando-se uma extrapolação dos dados, aumentando o número de animais por grupo, mas mantendo a mé-

dia dos dados obtidos. Desta forma, acredita-se que a repetição deste teste, porém com uma quantidade maior de animais ( $N= 9$  animais/grupo), da mesma forma que no LCE e campo aberto, seria possível reduzir a variação dos resultados levando a significância estatística.

Outro teste complementar necessário é a avaliação da atividade hipno-sedativa, quando estamos avaliando a possível atividade ansiolítica de compostos puros ou extratos, pois esta é uma das atividades de fármacos com ação do tipo benzodiazepínico. Geralmente, o teste mais utilizado para a avaliação de possíveis propriedades hipno-sedativas de compostos com ação central desconhecida é o teste do sono induzido por barbitúricos, como o pentobarbital sódico (CARLINI et al., 1986). No entanto, os compostos de plantas promovem interações farmacocinéticas com os barbitúricos em função de sua interação com o complexo do citocromo P450, o que pode levar à potencialização dos efeitos depressores centrais e, conseqüentemente, a resultados falso-positivos de compostos desprovidos de ação hipno-sedativa. Em função disso, Vieira (2001) desenvolveu o teste do sono induzido por éter etílico. Nossos resultados demonstraram que o tratamento agudo com EA de *Tynanthus micranthus* não reduziu de forma significativa ( $p>0,05$ ) a latência, e nem aumentou de forma significativa ( $p>0,05$ ) a duração do sono induzido por éter etílico, quando comparado com o grupo controle.

A redução da latência e o aumento da duração do sono induzido por éter etílico se referem ao comportamento padrão ocasionado por compostos hipno-sedativos, como por exemplo, o composto benzodiazepínico diazepam, o qual foi utilizado como droga padrão. O tratamento de diazepam, no teste realizado com uma pequena quantidade de animais ( $N= 5-6$  animais/grupo) em nosso estudo, não apresentou resultados com significância estatística, porém a avaliação das médias e extrapolação dos dados observa-se uma tendência dos dados conforme o esperado, isto é, de mostrar um efeito hipno-sedativo.

Assim, extrapolando os dados dos grupos tratados, aumentando o número de animais por grupo, porém mantendo a média dos dados obtidos, observou-se que ocorre uma tendência do EA de *Tynanthus micranthus*, na concentração de 100 mg/kg, administrado por via oral, para um efeito contrário do apresentado para o diazepam. Ou seja, observa-se uma tendência no aumento da latência e uma redução na duração do sono induzido por éter etílico. Desta forma, acredita-se que a repetição deste teste, porém com uma quantidade maior de animais ( $N= 9$  animais/grupo), seria possível reduzir a variação dos resultados levando a significância estatística.

Avaliando as tendências de efeitos observados para a concentração de 100 mg/kg, do EA de *Tynanthus micranthus*, administrado por via oral, nos testes de LCE, campo aberto e sono induzido por éter etílico, a realização destes testes com um número maior de animais por grupo, possibilitaria verificar, com maior segurança, se este extrato apresenta propriedades ansiolíticas, porém com a ausência de efeitos hipnosedativos, apresentando mecanismos de ação diferentes do apresentado por compostos benzodiazepínicos.

Tanto a ansiedade como as convulsões epiléticas podem ser consideradas, em parte, como decorrentes de um desequilíbrio entre a excitabilidade de determinados circuitos neuronais e a inibição dos disparos elétricos. Sugere-se que este desequilíbrio possa ser, dentre outros fatores que não podem ser menosprezados, decorrente de uma diminuição da neurotransmissão inibitória GABAérgica mediada pelo receptor GABAA (MACDONALD; OLSEN, 1994). Assim, drogas que aumentam a atividade GABAérgica, tais como agonistas GABAérgicos e moduladores alostéricos positivos do receptor GABAA, apresentam, dependendo da dose, efeitos ansiolítico e anticonvulsivante (HANSEN et al., 2004; MACDONALD; OLSEN, 1994). Em contrapartida, drogas que diminuem a atividade GABAérgica, como os antagonistas GABAérgicos, moduladores alostéricos negativos e bloqueadores do canal de cloreto deste receptor, produzem efeitos ansiogênico em doses menores e convulsivante em doses mais elevadas (MACDONALD; OLSEN, 1994; ZORUMSKI; ISENBERG, 1991).

Sendo assim, além dos testes para a avaliação da atividade ansiolítica, realizam-se testes complementares para avaliar o do efeito anticonvulsivante de um determinado composto ou extrato. Este poderá ser avaliado pelos testes de convulsões induzidas por PTZ e convulsões induzidas por eletrochoque corneal.

A convulsão induzida por PTZ é considerada como o principal modelo experimental agudo para a avaliação preliminar de drogas com potencial atividade anticonvulsivante (SWINYARD et al., 1952; CZUCZUWAR; FREY, 1986). Ao contrário de drogas como o PTZ, os BDZ interagem com seu próprio sítio receptor, aumentando alostericamente a afinidade de ligação do GABA pelo receptor GABAA, amplificando a frequência de abertura do canal de cloreto, e diminuindo, portanto, a excitabilidade nervosa. Por sua vez, o PTZ é capaz de diminuir esta afinidade, com conseqüente diminuição da frequência de abertura do canal de cloreto, desencadeando, desta forma, um aumento da excitabilidade neuronal e diminuindo o limiar de convulsão (LÖSCHER; SCHMIDT, 1988). O mecanismo exato pelo qual o PTZ exerce suas a-

ções ainda não é bem compreendido; entretanto, sugere-se que esta droga atue como um antagonista do sítio sensível à picrotoxina (domínio transmembrânico TM2, que forma o canal de cloreto) do complexo receptor GABAA (RAMANJANEYULU; TICKU, 1984), deprimindo a corrente mediada pelo GABA.

Durante o teste de convulsões induzidas por PTZ, esperava-se que tratamento com o benzodiazepínico diazepam protegesse completamente os animais das convulsões quando comparados com o grupo controle, aumentando o tempo de latência, reduzindo a duração da primeira convulsão clônica e reduzindo a severidade das convulsões.

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com DZP aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) a latência para a primeira convulsão clônica, e protegeram os animais contra as convulsões ocasionadas pelo PTZ, demonstrando confiabilidade dos resultados obtidos. No entanto, não foi possível observar uma redução significativa ( $p > 0,05$ ) na severidade das convulsões com pequeno número de animais ( $N = 5$  animais/grupo), mas foi possível observar uma tendência para este resultado, quando comparado com o grupo controle.

De novo, extrapolando os dados dos grupos tratados, aumentando o número de animais por grupo, porém mantendo a média dos dados obtidos, observou-se que ocorre uma tendência do EA de *Tynanthus micranthus*, na concentração de 300 mg/kg, administrado por via oral, quando comparado com o grupo controle, para apresentar um efeito anticonvulsivante. Observou-se uma tendência para o aumento da latência e de duração da primeira convulsão clônica, além do aumento do tempo de morte, parâmetros semelhantes aos efeitos apresentados pelos compostos benzodiazepínicos. Entretanto, também foi observada uma tendência para o aumento da severidade das convulsões induzidas, efeito este contrário ao apresentado por compostos benzodiazepínicos. Mesmo apresentando esta tendência de aumento na severidade de convulsões induzidas por PTZ, acredita-se que a repetição deste teste, com uma quantidade maior de animais ( $N = 9$  animais/grupo), poderia reduzir a variação dos resultados levando a significância estatística.

No teste de convulsões induzidas por eletrochoque corneal (ECM) os BDZ não são capazes de proteger de forma efetiva as convulsões induzidas neste teste. O padrão de convulsão comportamental observado no ECM é caracterizado pela flexão das patas anteriores seguido da extensão tônica das patas posteriores. Os parâmetros clássicos utilizados na investigação de drogas com potencial ação anticonvulsivante neste teste são: tempo da extensão tônica das patas posteriores e a porcentagem de animais que apresentaram o componente extensor. De ma-



neira geral, drogas capazes de proteger convulsões induzidas por PTZ interagem com a neurotransmissão GABAérgica, enquanto aquelas capazes de inibir as convulsões por ECM tanto podem afetar canais de  $\text{Na}^+$  como bloquear receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (ROGAWSKI; PORTER, 1990). Sabe-se que convulsões límbicas induzidas por estimulação com 6 Hz é particularmente limitada a estruturas límbicas e são relativamente insensíveis a anticonvulsivantes bloqueadores de canais de  $\text{Na}^+$  (BARTON et al., 2001).

Nossos resultados mostraram o que foi descrito acima. O tratamento com diazepam no teste de convulsões induzidas por eletrochoque corneal, não reduziu de forma significativa ( $p > 0,05$ ) o tempo de extensão das patas posteriores e o tempo de recuperação, quando comparado com o grupo controle. Já para o tratamento com a fenitoína no teste de convulsões induzidas por eletrochoque corneal, reduziu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o tempo de recuperação, conforme esperado, possibilitando a confiabilidade dos resultados obtidos.

Os resultados do tratamento agudo com EA de *Tynanthus micranthus*, em grupos com pequena quantidade de animais ( $N = 5$  animais/grupo), não reduziu de forma significativa ( $p > 0,05$ ) o tempo de extensão das patas posteriores e do tempo de recuperação das convulsões induzidas por eletrochoque corneal, quando comparado com o grupo controle.

Através de uma extrapolação dos dados, aumentando o número de animais por grupo, porém mantendo a média dos dados obtidos, observou-se que ocorre uma tendência para o efeito anticonvulsivante semelhante ao da fenitoína, para o EA de *Tynanthus micranthus*, na concentração de 600 mg/kg, administrado por via oral, reduzindo o tempo de extensão das patas posteriores e o tempo de recuperação das convulsões induzidas por eletrochoque corneal. Desta forma, acredita-se novamente que a repetição deste teste, porém com uma quantidade maior de animais ( $N = 9$  animais/grupo), seria possível reduzir a variação dos resultados levando a significância estatística.

Além dos testes realizados conforme descrito acima foi avaliada a atividade antidepressiva do EA de *Tynanthus micranthus*. Para a avaliação deste tipo de atividade, comumente são utilizados os testes do nado forçado e de suspensão pela cauda e, em alguns casos, se utiliza diferentes linhagens de camundongos (Swiss, C57Bl/6J e NMRI, por exemplo) (BOURIN et al., 2005). Outros testes podem ser utilizados, como o teste de desamparo aprendido e testes de recompensa frustrada. Como drogas padrão nestes testes utilizam-se antidepressivos convencionais como a fluoxetina, a imipramina e a desipramina (ZHANG, 2004).

O teste da suspensão pela cauda, o qual foi escolhido para o nosso estudo, baseia-se na observação de que os roedores, após o comportamento inicial de tentar ativamente escapar, desenvolvem uma postura de imobilidade quando colocados em uma situação de estresse inescapável (BOURIN et al., 2005; CRYAN et al., 2005; STÉRU et al., 1985). A imobilidade é interpretada como o declínio da persistência em tentar escapar da situação estressante, através do estabelecimento de um comportamento passivo do animal (CRYAN et al., 2005; STÉRU et al., 1985).

Considerando que drogas antidepressivas utilizadas na clínica promovem e aumentam o engajamento dos animais em comportamentos direcionados à tentativa de escape, a redução do tempo de imobilidade no teste da suspensão pela cauda tem sido interpretada como um indicativo de atividade tipo-antidepressiva em camundongos (BOURIN et al., 2005; CRYAN et al., 2005; STÉRU et al., 1985). Este teste apresenta algumas vantagens quando comparado a outros testes, como sua habilidade em detectar os efeitos de um amplo espectro de drogas antidepressivas, independentemente de seus mecanismos de ação, além de seu baixo custo, sua metodologia simples e de não necessitar treinamento prévio (BOURIN et al., 2005; CRYAN et al., 2005). Por exemplo, o teste do nado forçado, também muito utilizado para detectar os efeitos de drogas antidepressivas, não tem se mostrado tão eficaz na detecção da atividade de inibidores seletivos da recaptação de serotonina, embora exista certa polêmica a este respeito (CRYAN et al., 2005; JACOBSON; CRYAN, 2007).

Nossos dados indicam que o tratamento agudo com EA de *Tynanthus micranthus* não aumentou de forma significativa ( $p>0,05$ ) o tempo de latência, nem reduziu significativamente ( $p>0,05$ ) a duração da imobilidade no teste de suspensão pela cauda, comparando-se os grupos tratados com o grupo controle. O tratamento agudo com imipramina, droga antidepressiva padrão, reduziu significativamente ( $p<0,05$ ) o tempo de imobilidade, possibilitando a confiabilidade dos resultados, porém não aumentou o tempo de latência para o primeiro comportamento de imobilidade de forma significativa ( $p>0,05$ ), quando comparado com o grupo controle.

Mais uma vez, através de uma extrapolação dos dados, aumentando o número de animais por grupo, porém mantendo a média dos dados obtidos, observou-se que ocorre uma tendência para a redução do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda, semelhante com o efeito da imipramina, para o EA de *Tynanthus micranthus*, na concentração de 300 mg/kg, administrado por via oral.

Sabe-se que os efeitos antidepressivos das drogas padrões utilizadas apresentam resultados de forma satisfatória com tratamentos subcrônicos (3 doses no período de 24 h) e crônicos (1 dose por dia durante 14 a 21 dias de forma contínua). Desta forma, acredita-se que a repetição deste teste, porém com uma quantidade maior de animais (N= 9 animais/grupo), realizando um tratamento subcrônico e crônico, permitiria reduzir a variação dos resultados levando a significância estatística, e estabelecer condições semelhantes aos utilizados na terapêutica (avaliação do efeito antidepressivo crônico).

Na Tabela 16, são apresentados de forma geral, os resultados obtidos nos testes realizados na avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do EA de *Tynanthus micranthus*. Observou-se que, no que se refere à atividade ansiolítica, ocorre uma tendência para este efeito, na concentração de 100 mg/kg do EA de *Tynanthus micranthus*, administrado por via oral agudamente, demonstrado nos testes de labirinto em cruz elevado e do campo aberto. Aparentemente, os resultados sugerem que substâncias presentes do EA da *T. micranthus* podem ser ansiolíticas com mecanismo de ação diferente dos benzodiazepínicos, uma vez que não foi observado, nesta concentração, qualquer efeito hipnosedativo, anticonvulsivante ou na coordenação motora.

No que se refere a avaliação da atividade antidepressiva, observou-se que ocorre uma tendência para este efeito na concentração de 300 mg/kg do EA de *Tynanthus micranthus*, administrado por via oral. No entanto, é preciso que a comprovação deste efeito seja realizada após tratamento subcrônico e crônico.

Quanto ao teste hipocrático, os efeitos observados despertaram o interesse em avaliar uma possível atividade analgésica do EA, o que será realizado, uma vez que este efeito foi bastante evidente durante a realização deste teste.

**Tabela 16** – Resultados gerais encontrados para os testes realizados na avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do EA de *Tynanthus micranthus*, em tratamento agudo.

TESTE	FINALIDADE	RESULTADO SIGNIFATIVO	TENDÊNCIA E SUGESTÃO
<b>Hipocrático</b>	Toxicidade Aguda Efeitos e latência	Baixa toxicidade, Analgesia	Avaliação da atividade analgésica (em andamento).
<b>Labirinto em cruz elevado</b>	Ação ansiolítica	Negativo	100 mg/Kg. Aumentar N.
<b>Campo-aberto</b>	Ação ansiolítica	Negativo	100 mg/Kg. Aumentar N.
<b>Chaminé</b>	Coordenação motora	Negativo	Interferência. Avaliar atividade motora através de outros testes, como o rota-rod.
<b>Esconder esferas</b>	Ação ansiolítica	Negativo	300 mg/Kg. Aumentar N; Realizar teste e reteste para avaliação de TOC, e comparação de tratamento agudo, subcrônico e crônico.
<b>Sono induzido por éter etílico</b>	Ação hipno-sedativa	Negativo	Ausência de efeito hipno-sedativo para a concentração de 100 mg/Kg. Aumentar N.
<b>Convulsão induzida por</b>	Ação anticonvulsi-	Negativo	300 mg/Kg. Aumentar N

<b>PTZ</b>		vante				
<b>Convulsão induzida por eletrochoque máximo</b>		Ação anticonvulsivante	Negativo	600 mg/Kg. Aumentar N.		
<b>Suspensão pela cauda</b>		Ação antidepressiva	Negativo	300 mg/Kg. Aumentar N; Avaliar efeito com tratamento subcrônico e crônico.		

Na literatura, não foi encontrado estudos que avaliem o potencial de atividade no Sistema Nervoso Central para a espécie em estudo, assim como do gênero *Tynanthus*. Desta forma, os estudos realizados são considerados inéditos, dificultando a comparação dos resultados obtidos com os demais trabalhos. Dentre as espécies de *Tynanthus*, a espécie *Tynanthus fasciculatus* é a que apresenta maior quantidade de estudos na literatura, sendo que nenhum deles se refere a atividades no sistema nervoso central.

Até o momento, tem-se conhecimento de uma potencial atividade analgésica e um efeito de protetor contra a redução de comportamentos sexuais e de aprendizagem em camundongos, através do tratamento de verbascosídeo, composto isolado da planta *Tynanthus panurensis*, o que pode servir de evidência para o uso popular como afrodisíaco (PLAZA et al., 2005).

Outros estudos realizados estão relacionados com a ação anti-helmíntica da casca do caule da planta *Tynanthus fasciculatus*, mostrando reduzir significativamente o número de verminoses em camundongos. Outra atividade avaliada foi o potencial toxicológico dessa planta, testando a sua possível capacidade mutagênica em células de camundongo. Este efeito não foi observado, demonstrando a atividade como agente anti-helmíntico dessa espécie, com índices terapêuticos bastante favoráveis (AMORIM et al., 1991; AMORIM et al., 1994; LOPES et al., 2008).

Quanto a avaliação das alterações no aparelho reprodutor em ratos Wistar adultos tratados com infusão do caule de *T. fasciculatus*, realizados por Melo (2007), resultados demonstram que o tratamento na dose de 100 mg/Kg, promove aumento no número de células de Leydig. Já o tratamento na dose de 200 mg/Kg, promove maior produção espermatogênica, não sendo observadas estruturas que demonstrassem alterações no parênquima testicular ou mesmo o comprometimento da espermatogênese em ratos Wistar adultos.

Outra atividade observada para a espécie *Tynanthus fasciculatus* está relacionada com a presença de eugenol, principal constituinte do óleo desta planta. Estudo realizado por Burgo e colaboradores (2006), avaliou a atividade antifúngica do óleo essencial desta planta, demonstrando uma potencial atividade do óleo essencial contra *Claudosporium herbarum*, estando relacionada com o eugenol.

No que se refere à espécie *Tynanthus micranthus*, os estudos quanto a atividades comprovadas são ainda mais restritos na literatura. Cansian (2010) realizou estudos avaliando diferentes atividades através de diferentes extratos da raiz, caule e folha. A pesquisa demonstrou

fraca atividade antimicrobiana de diferentes extratos da planta *Tynanthus micranthus* contra *E. coli* (Extrato bruto da raiz e caule), *S. aureus* e *P. aeruginosa* (extrato bruto do caule e folha), todas com concentração mínima de 1000 µg/mL. Para a atividade antioxidante, a fração que melhor apresentou resultado no teste de redução do complexo fosfomolibdênio foi a fração clorofórmio folha, sendo similar à rutina. Na avaliação frente à enzima tirosinase, a fração hidroalcoólica folha apresentou atividade ao estimular a tirosinase na concentração de 100 µg/mL. No teste de toxicidade frente à *Artemia salina*, as frações de acetato de etila da raiz, caule e folha, fração clorofórmico caule e folha apresentaram relativa toxicidade, com valor de DL<sub>50</sub> inferior a 1000 µg/mL, igual ao sulfato de quinidina, utilizado como controle positivo.

Diversos estudos demonstram que o eugenol apresenta efeitos antidepressivos semelhantes aos apresentados pela imipramina (IRIE et al., 2004; TAO et al., 2005). A presença de eugenol em espécies do gênero *Tynanthus*, uma vez que seu cheiro é característico do gênero. Desta forma, possíveis efeitos antidepressivos que extrato de planta deste gênero possam estar relacionada a presença de eugenol em suas folhas. Com isso, se desperta um interesse ainda maior na avaliação de uma possível atividade antidepressiva do extrato da espécie *Tynanthus micranthus*.

A necessidade da indústria de aumentar a sua linha produtiva para se manter competitivo no mercado, desperta o interesse em desenvolver novos medicamentos. Ao contrário dos enormes investimentos, dos altos riscos e longo tempo de desenvolvimento de uma droga inovadora (nova entidade química), restrito a algumas indústrias multinacionais sediadas em poucos países desenvolvidos, o desenvolvimento de um fitomedicamento com comprovação científica de segurança, eficácia e qualidade, demanda muito menos recursos e, conseqüentemente menores riscos, tornando-se uma opção acessível para as empresas (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008).

A indústria farmacêutica ao iniciar os estudos para o desenvolvimento de um fitoterápico poderá optar por:

- Espécie presente na lista de espécies vegetais de registro simplificado, conforme IN nº 05/08, os quais dispensam a apresentação de comprovação de eficácia e segurança no processo de registro, desde que seguido os critérios determinados na legislação;
- Espécie que apresenta diversos estudos na literatura científica e que é amplamente conhecido por suas atividades e utilizado popularmente para uma determinada finalidade; ou então,

- Espécie que apresenta na literatura científica quantidades de trabalhos restritos, no que se refere à atividade farmacológica, e o conhecimento sobre o seu uso popular típico de cada região.

Conforme diminui o conhecimento científico da atividade farmacológica de uma espécie na literatura, aumentam-se os riscos quanto à viabilidade do projeto, e a avaliação do custo apresenta menor precisão. Isso ocorre porque não se tem certeza do direcionamento do projeto no momento de ser montada uma proposta, pois somente com análises prévias do extrato vegetal é possível selecionar testes ou modelos que passem a apresentar resultados satisfatórios quanto a descoberta de atividades. Isto representa, na maioria das vezes, um tempo ainda maior de P&D até o produto ser aprovado e comercializado. Dessa forma, a maioria dos centros de pesquisas prefere selecionar plantas conhecidas cientificamente para reduzir este tempo de P&D.

A proposta do presente trabalho, avaliando o custo de atividades realizadas com uma espécie vegetal pouco conhecida cientificamente, foi a de verificar se a aplicação de modelos comportamentais pode contribuir para a descoberta de plantas promissoras para as atividades ansiolíticas e antidepressivas.

Os resultados demonstraram que, com um custo direto de R\$ 4.233,73 observou-se que a espécie vegetal em questão apresenta tendência para resultados positivos em testes que envolvem a efeitos analgésicos. No que se refere à atividade ansiolítica e antidepressiva, a espécie vegetal, especificamente seu extrato bruto, não apresentou resultados significativamente positivos, com a pequena quantidade de animais utilizados, o que mostra o risco envolvido ao se escolher uma espécie vegetal que não possua uma literatura expressiva. Entretanto, uma análise mais detalhada dos dados obtidos, sugere uma tendência para efeitos ansiolíticos e antidepressivos, os quais só poderão ser confirmados com a realização de novos testes com um número maior de animais por grupo e, no que se refere à atividade antidepressiva, também a realização de um tratamento subcrônico e crônico.

O teste de triagem hipocrática demonstrou ser um teste de custo relativamente baixo (R\$ 170,18) e que proporciona resultados importantes na decisão da via de administração, toxicidade aguda, efeitos observados com altas doses e diferentes vias, além do tempo após a administração do extrato para serem observados efeitos comportamentais importantes.

Com essas informações e uma análise fitoquímica mais aprofundada, isolando e identificando os compostos que estão presentes em maior concentração na planta, é possível avaliar na literatura a relação



composto x atividade farmacológica direcionando de forma mais assertiva as pesquisas realizadas. Uma das formas seria investigar a atividade de interesse administrando-se compostos isolados ou então frações nos quais estes estão presentes em maior quantidade.

A implantação desta atividade na P&D de indústrias farmacêuticas nacionais, favorecendo o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, está relacionada a diversas barreiras enfrentadas, como a atividade de desenvolvimento de medicamentos genéricos e similares estabelecida nas indústrias, falta de funcionários capacitados e estrutura para o desenvolvimento de fitoterápicos e necessidade de retorno financeiro imediato dos investimentos realizados.

Mesmo com o apoio por parte do Governo Federal, através do Programa de Subvenção Econômica, e a biodiversidade que o Brasil possui, para algumas indústrias, a P&D de fitoterápicos não está entre suas prioridades. Uma das justificativas para tal decisão é a queda de diversas patentes até o ano de 2013 (FOLLI, 2011), fazendo com que as indústrias farmacêuticas destinem seus investimentos na compra de equipamentos e melhorias de processo para a P&D e, posteriormente, o lançamento e produção de genéricos destes medicamentos, de retorno financeiro muito mais rápido.

Vale a pena ressaltar, no entanto, que essa necessidade de retorno financeiro em curto prazo de tempo, proporcionado pela produção de medicamentos genéricos, torna a empresa dependente do mercado exterior, pois a maior parte da matéria-prima utilizada para a produção dos mesmos é importada. Além disso, com o lançamento de um medicamento fitoterápico, a empresa terá um retorno financeiro em prazo de tempo maior, porém será um produto inovador o qual, por ser fitoterápico, não apresentará seu valor de venda controlado pela Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos (CMED), o que certamente é vantajoso para a empresa. Outra vantagem da produção de fitoterápicos é que, com o lançamento do mesmo, na maioria das vezes o retorno financeiro é maior do que o investido, além da empresa estar diversificando a sua linha de produção.

Uma alternativa para as empresas que não apresentam estrutura física, funcionários qualificados, entre outros, para a P&D de fitoterápicos, e desejam se dedicar a produção de genéricos, mas querem diversificar a sua linha produtiva com a produção de fitoterápicos em longo prazo, é realizar parcerias com universidades.

Um exemplo prático dessa parceria é o desenvolvimento do anti-inflamatório tópico Acheflan® (Laboratório Aché), produzido a partir da planta *Cordia verbenacea*, que ocorre na mata Atlântica. Todos os

estudos relacionados ao seu desenvolvimento foram realizados no Brasil durante sete anos, tendo sido investidos mais de R\$ 15 milhões em pesquisa mediante parcerias com quatro importantes universidades nacionais (Universidade Federal de Santa Catarina, Universidade Federal de São Paulo, PUC-Campinas e UNICAMP). Desde o seu lançamento, em 2005, o produto Acheflan® é o mais prescrito pela classe médica brasileira dentro dos antiinflamatórios tópicos (cerca de 44% das prescrições médicas) (CALIXTO; SIQUEIRA JR. 2008; RODRIGUES, 2005). Em 2005, o faturamento da empresa Aché foi de R\$ 1,1 bilhão e obteve um lucro líquido de R\$ 87 milhões, quase o dobro do auferido no ano anterior. Neste ano, após a compra da Biosintética Farmacêutica Ltda, o Laboratório Aché alcançou a primeira posição no *ranking* farmacêutico nacional, com aproximadamente 7 % de participação. O faturamento obtido resultou do lançamento de dois novos medicamentos, do Remotiv® (à base de *Hypericum perforatum*) e, principalmente, do Acheflan®. Certamente, o retorno financeiro obtido com a venda do Acheflan® ultrapassou o valor investido no desenvolvimento do mesmo (TUROLLA; DE LIMA, 2007).

Outro exemplo é o do Herbarium Laboratório Botânico Ltda. Recentemente foi premiado pela Confederação Nacional das Indústrias (CNI), com o prêmio Parcerias para Inovação Tecnológica - modalidade Redes de Pesquisa e com o Prêmio Expressão Tecnológica da FINEP, apresentando projetos de pesquisa com fitoterápicos. Um destes projetos refere-se ao fitoterápico Imunomax® utilizado para o tratamento de herpes labial, desenvolvido a partir da planta *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato), da floresta Amazônica. Este projeto foi realizado em parceria com a Universidade Federal de Santa Catarina e com a Universidade Federal Fluminense e teve um investimento de R\$ 3 milhões. O produto foi lançado em julho de 2005 (RODRIGUES, 2005).

Segundo Rodrigues (2005), os fatores que dificultam a parceria entre universidade e empresa para o desenvolvimento deste tipo de trabalho são:

- Falta de investimentos suficientes por parte das empresas de fitoterápicos existentes no Brasil, seja porque a maior parte delas é de pequeno e médio porte, seja porque o número de grupos de pesquisas trabalhando na área de plantas medicinais é muito grande em relação ao número de indústrias investindo nesta área;
- Resistência de alguns pesquisadores em desenvolver projetos junto/com apoio de empresas privadas;
- Legislação atual de acesso a recursos genéticos e de conhecimento tradicional associado, que além de dificultar a obtenção da matéria-

prima para ser submetida a experimentos de farmacologia e fitoquímica, praticamente inviabiliza o desenvolvimento dos projetos de etnofarmacologia, que reduziriam o tempo e os recursos necessários para o desenvolvimento de fitoterápicos.

Por outro lado, a parceria entre universidade e empresa proporciona diversas vantagens para ambos, como:

- A capacitação científica em praticamente todas as áreas do estudo das plantas medicinais (botânica, farmacologia, fitoquímica, médica, agrônômica), sobretudo em decorrência dos cursos de pós-graduação disponíveis no País;
- Geração de renda para a universidade pública brasileira, de maneira que produzem dados muitas vezes não divulgáveis (por serem patenteáveis), e paralelamente realize pesquisas acadêmicas, financiadas pelas instituições de fomento (destinadas a produção de artigos científicos), como estratégia de “sobrevivência acadêmica”;
- Produção de fitoterápicos com qualidade, eficácia e segurança para a população de modo geral;
- Grande oportunidade de desenvolvimento do Brasil e geração de patentes, que podem reverter capital a ser investido nos próprios departamentos, promovendo um incremento em termos de equipamentos, por exemplo, de maneira a possibilitar novos estudos (RODRIGUES, 2005).

Sendo assim, as indústrias farmacêuticas nacionais possuem alternativas para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, seja através de investimentos em infra-estrutura e capacitação profissional e/ou por meio de parceiras. O interesse em ampliar a variedade de produtos produzidos, optando por produtos novos que requerem menor investimento e apresentam grande retorno financeiro, é visível por parte das empresas. Faltam, entretanto, empresas que estejam dispostas a investir nesta área sabendo que o retorno será a médio-longo prazo, diferente dos medicamentos genéricos, nos quais estão experientes tanto em investir como em produzir e cujo retorno financeiro é imediato, mas finito.

## 6 CONCLUSÕES

- A análise fitoquímica preliminar das folhas de *Tynanthus micranthus* permitiu a caracterização de cumarinas voláteis, polifenóis, taninos, catequinas, flavonóides e saponinas, sendo alguns deles relatados na literatura;
- O tratamento agudo com altas doses de EA, por via i.p. e v.o., realizado no teste de triagem hipocrática, demonstrou não ser tóxico em altas doses com o tratamento agudo. Além disso, foi possível observar um efeito analgésico em todas as concentrações e vias administradas;
- Nos testes de labirinto em cruz elevado e campo aberto não foi possível observar um efeito ansiolítico significativo, no tratamento agudo oral de EA. Porém, observou-se uma tendência de efeito ansiolítico para a concentração de 100 mg/Kg;
- No teste de sono induzido por éter etílico, não foi possível observar um efeito hipno-sedativo significativo, no tratamento agudo oral de EA. A tendência observada para a concentração de 100 mg/Kg, demonstra não apresentar efeito hipno-sedativo;
- Nos testes de convulsão induzida por pentilenotetrazol e por eletrochoque corneal não foi possível observar um efeito anticonvulsivante significativo, no tratamento agudo oral de EA. Porém, observou-se tendência para as concentrações de 300 mg/Kg e 600 mg/Kg, respectivamente;
- O teste da chaminé, com tratamento com EA de *Tynanthus micranthus*, demonstrou não ser um teste adequado para a avaliação do prejuízo motor, pois os animais apresentaram dificuldade em executar o teste por fatores fisiológicos;
- O tratamento agudo com EA em animais submetidos ao teste de esconder esferas demonstrou ocorrer uma tendência de resultados positivos para a concentração de 300 mg/Kg, indicando uma possível utilização para pesquisas de TOC;
- Com tratamento agudo, por via oral, do EA não demonstrou apresentar atividade antidepressiva no teste de suspensão pela cauda de forma significativa. Observa-se uma tendência de efeito antidepressivo para a concentração de 300 mg/Kg, porém é necessário a realização de testes com tratamento subcrônico e crônico;
- O teste de triagem hipocrática apresentou um custo baixo e fornece resultados importantes para a decisão das pesquisas a serem realizadas;

- Os custos gerados demonstram que a realização de testes comportamentais para a investigação de possíveis plantas promissoras para novos produtos representam uma ferramenta importante, mas que deve ser utilizada de forma consciente, para evitar desperdícios quanto à mão-de-obra, material aplicado e depreciação de equipamentos;
- Parcerias entre universidades e empresas podem resultar em pesquisas com resultados satisfatórios, o que pode ser uma alternativa viável para o desenvolvimento a médio e longo prazo de novos medicamentos fitoterápicos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, A.; ARMADA, J.L.; BORBA, H.R.; SALLES, J.F. Testes de mutagenicidade em camundongos tratados com extratos aquosos de *Tynanthus fasciculatus* Miers (cipó-cravo). **Rev. Bras. Farmácia**, v.75, n.2, p.46-47, 1994.

AMORIM, A.; BORBA, H.R.; AMANO, L. M. Ação anti-helmíntica de plantas IV: influência da casca do caule de cipó-cravo (*Tynanthus fasciculatus* Miers; Bignoniaceae) na eliminação de *Vampirolepis nana* e de oxiurídeos em camundongos. **Rev. Bras. Farmácia**, v.72, n.4, p.94-92, 1991.

ANVISA - BRASIL. Resolução – RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”. **Diário Oficial [da] União**, 18 de março de 2004.

ANVISA - BRASIL. Resolução – RE nº 91, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da “Guia para a realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós registro de fitoterápicos”. **Diário Oficial [da] União**, 18 de março de 2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos Fitoterápicos – Definição. 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm>>. Acesso em: 22 fev. 2011.

ANVISA. Consolidado de normas da COFID. Versão II. Brasília, mai. 2010. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/medicamentos?cat=Medicamentos+fitoterapicos&cat1=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM\\_Category%2FMedicamentos+fitoterapicos%2F688d6f804f6be547af47bfc894994279%2FPUBLISHED&con=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM\\_Content%2FMedicamentos+fitoterapicos%2F47930180402ca29db76fb754e035b7cb%2FPUBLISHED&showForm=no&siteArea=Medicamentos&WCM\\_GLOBAL\\_CONTEXT=/wps/wcm/connect/anvisa/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Publicacao+Medicamentos/Medicamentos+fitoterapicos](http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/medicamentos?cat=Medicamentos+fitoterapicos&cat1=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM_Category%2FMedicamentos+fitoterapicos%2F688d6f804f6be547af47bfc894994279%2FPUBLISHED&con=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM_Content%2FMedicamentos+fitoterapicos%2F47930180402ca29db76fb754e035b7cb%2FPUBLISHED&showForm=no&siteArea=Medicamentos&WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/anvisa/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Publicacao+Medicamentos/Medicamentos+fitoterapicos)>. Acesso em: 22 fev 2011.

BARTON, M.E; KLEIN, B.D.; WOLF, H.H.; WHITE, H.S. Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. **Epilepsy Res.**, v.47, n.3, p.217-227, 2001.

BELEM JARDIM. Descrição do produto Sexotone. Belém Jardim Fitoterápicos, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2011. Disponível em: <<http://www.belemjardim.com.br/site/sexotone.html>>. Acesso em: 22 mar. 2011.

---

- BOLSON, M. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais nativas utilizadas pela população dos municípios de São Pedro do Iguaçu e Vera Cruz do Oeste, Paraná, Brasil. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Toledo, PR, 2009.
- BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIÈTE, B.; DHONNCHADHA, B.N.; HASCÔET, M. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.21, p.567–574, 2007.
- BOURIN, M.; CHENU, F.; RIPOLL, N.; DAVID, D.J.P. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. **Behavioural Brain Res.**, v.164, p.266–269, 2005.
- BRANDÃO, M.G.L.; COSENZA, G.P.; GRAEL, C.F.F.; NETTO JUNIOR, N.L.; MONTE-MÓR, R.L.M. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v.19, n.2A, p.478-487, abr./jun. 2009.
- BRASIL. Resolução – RDC nº 39, de 5 de junho de 2008. Aprova o “Regulamento para a realização de pesquisa clínica” e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União**, 1 de agosto de 2008.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n.1, p.229-239, 2010.
- BURGO, R.P.; ISHIKAWA, N.K.; PINTO, J.P.; FARIA, T.J. Estudo da composição química e atividade antifúngica do óleo essencial de *Tynanthus fasciculatus*. In: 29ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. QUÍMICA É ENERGIA: TRANSFORMA A VIDA E PRESERVA O AMBIENTE. São Paulo, 2006. Disponível em: <<https://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos%5CT1060-1.pdf>>. Acesso em: 07 mai. 2010.
- CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America – A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**. v.100, p.131-134, 2005.
- CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA JR., J.M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. v.78, supl. 1, p.98-106, 2008.
- CANSIAN, F.C. Estudo Fitoquímico e Atividades Biológicas da Espécie *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo (Bignoniaceae). 2010. 101f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, UFPR, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Curitiba, PR, 2010.
- CARLINI, E.A.; CONTAR, J. DE D.P.; SILVA-FILHO, A.R.; DA SILVEIRA-FILHO, N.G.; FROCHTENGARTEN, M.L.; BUENO, O.F. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of

teas prepared from the leaves on laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.**, v.17, n.1, p.37-64, 1986.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.29, n.8, p.1193-205, 2005.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev. Bras. Farmacognosia**. v.18, n.2, p.314-319, 2008.

CARVALHO, C.A.; MATTA, S.L.P.; MELO, F.C.S.A.; ANDRADE, D.C.F.; CARVALHO, L.M.; NASCIMENTO, P.C.; SILVA, M.B.; ROSA, M.B. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers – Bignoniaceae): estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.6, n.1, p.51-58, 2009.

COLETA, M.; BATISTA, M.T.; CAMPOS, M.G.; CARVALHO, R.; COTRIM, M.D.; DE LIMA, T.C.M.; CUNHA, A.P. Neuropharmacological Evaluation of the Putative Anxiolytic Effects of *Passiflora edulis* Sims, its Sub-fractions and Flavonoid Constituents. **Phytother. Res.** v.20, p.1067-1073, 2006.

COSTA, A. F. Farmacognosia, Farmacognosia Experimental, vol. III, 3ª ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000.

CRYAN, J.F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, n.29, p.571-625, 2005.

CUNHA, L.C.; AZEREDO, F.S.; MENDONÇA, A.C.V.; VIEIRA, M.S.; PUCCI, L.L.; VALADARES, M.C.; FREITAS, H.O.G.; SENA, A.A.S.; LINO JUNIOR, R.S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Rev. Bras. Farmacognosia**. v.19, n.2A, p.403-411, abr./jun. 2009.

CZUCZWAR, S.J.; FREY, H.H. Effect of morphine and morphine-like analgesics on susceptibility to seizures in mice. **Neuropharmacol.**, v.25, n. 5, p. 465-469, 1986.

DI CARLO, G.; BORRELLI, F.; ERNST, E.; IZZO, A.A. St John's wort: Prozac from the plant kingdom. **TRENDS in Pharmacological Sciences**. v.22, n.6, p.292-297, 2001.

DUARTE, F.S. Participação das dihidroestiril-2-pironas e estiril-2-pironas nas ações centrais do tipo-benzodiazepínicas da planta *Polygala sabulosa* A. W. Bennett (Polygalaceae) em roedores. 2007. 133p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2007.

---



FOLLI, B. Farmacêuticas devem perder US\$ 95,5 bilhões com o fim de patentes. 29 mar 2010. Home IG – Economia – Empresas – Indústria. Disponível em: < <http://economia.ig.com.br/empresas/industria/farmacauticas+devem+perder+us+955+bilhoes+com+o+fim+de+patentes/n1300010722789.html>>. Acesso em: 31 mar 2011.

GARGANO, A.C. Estudo da atividade ansiolítica e sedativa do óleo essencial das cascas de frutos de espécies do gênero *Citrus*. 2007. 79f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2007.

GBI RESEARCH. Increase in aging population of developed countries is driving the pharmaceutical industry towards Growth. **Market Publishers**. 03 dez. 2010. Disponível em: <<http://marketpublishers.com/lists/8745/news.html>>. Acesso: 03 abr. 2011.

---

GENTRY, A.H. Bignoniaceae. Part I (Crescentieae and Tourrettieae). **New York: The New York Botanical Garden**, v.25, Flora Neotropica, 1980.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GRÖTICKE, I.; HOFFMANN, K.; LÖSCHER, W. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. **Experimental Neurology**. v.207, p.329-349, 2007.

GURIB-FAKIM, A. Review - Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**. v.27, p.1-93, 2006.

HANSEN, S. L.; SPERLING, B. B.; SÁNCHEZ, C. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABAA receptor ligands in pentylentetrazole-kindling mice. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.**, v.28: p.105-113, 2004.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.13, n.19/20, p.894-901, oct. 2008.

---

IRIE, Y.; ITOKAZY, N.; ANJIKI, N.; ISHIGE, A.; WATANABE, K.; KEUNG, W.M. Eugenol exhibits antidepressant-like activity in mice and induces expression of metallothionein-III in the hippocampus. **Brain Research**, v.1011, n.2, p.243-246, 2004.

JACOBSON, L.H.; CRYAN, J.F. Feeling strained? Influence of genetic background on depression-related behavior in mice: a review. **Behav. Genet.**, v.37, p.171-213, 2007.

KALUEFF, A.V.; TUOHIMAA, P. Experimental modeling of anxiety and depression. **Acta Neurobiol Exp.**, v.64, p.439-448, 2004.

---

- KALUEFF, A.V.; WHEATON, M.; MURPHY, D.L. What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. **Behavioural Brain Research.**, v.179, p.1-18, 2007.
- KULKARNI, S. K.; DHIR, A. Berberine: A plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. **Phytotherapy Research.** v.24, p.317-324, 2010.
- LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A. Caracterização Farmacológica da Atividade Farmacológica no Sistema Nervoso Central. Em: LAPA, A. J. et al. **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais.** SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS. Campinas: Expressão Gráfica, 2008. p.88-115.
- LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl.)**, v.92, n.2, p.180-185, 1987.
- LOHMANN, L.G. Bignoniaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>>. Acesso em: 06 abr. 2011.
- LOPES, M. M. M.; CARVALHO-OKANO, R.M.; SOUZA, A.L.; PAIVA, H.N. Crescimento de Mudanças de Cipó-Cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers), uma Liana com Potencial Medicinal. **Revista Árvore**, Viçosa, v.32, n.2, p.211-216, 2008.
- LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Res.**, v.2, n.3, p.145-81, 1988.
- MACDONALD, R. L.; OLSEN, R. W. GABAA receptor channels. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.17, p.569-602, 1994.
- MAGALHÃES, L.C.G.; LEAL, J.C.; SAFATLE, L.P.; AUREA, A.P.; TOMICH, F.A.; SILVEIRA, F. G.; BARBOSA, L.C.; CASTRO, B.R. Estratégias empresariais de crescimento na indústria farmacêutica brasileira: Investimentos, fusões e aquisições, 1988-2002. Texto para discussão nº 05. Brasília, dez. 2003. Disponível em: <[http://www.ipea.gov.br/pub/td/2003/td\\_0995.pdf](http://www.ipea.gov.br/pub/td/2003/td_0995.pdf)>. Acesso em: 29 nov. 2010.
- MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. The pharmacological evaluation of natura products - General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **J. Ethnopharmacol**, v.8, p.127-147, 1983.
- MEDEIROS, M.C.M.P. Revisão taxonômica, filogenia e evolução do nicho ecológico de Miers (Bignoniaceae, Bignoniaceae). 2010. Projeto para Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica. São Paulo, abr. 2010.
- MELO, F.C.S.A. Efeito da infusão do caule de cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers, Bignoniaceae) sobre as características de componen-

- tes testiculares de ratos wistar adultos. 2007. 101f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Programa Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Viçosa, Minas Gerais, 2007.
- MINISTÉRIO DA FAZENDA – RECEITA FEDERAL. BRASIL. Depreciação de Bens do Ativo Imobilizado. Disponível em: <<http://www.receita.fazenda.gov.br/PessoaJuridica/DIPJ/2005/PergResp2005/pr360a373.htm>>. Acesso em: 15 abr. 2011.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL. Instrução Normativa – IN nº 5, de 11 de dezembro de 2008. Determina a publicação da "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado". **Diário Oficial [da] União**, 12 de dezembro de 2008.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL. Instrução Normativa – IN nº 5, de 31 de março de 2010. Determina a publicação da "Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos". **Diário Oficial [da] União**, 05 de abril de 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL. Resolução – RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] União**, 5 de abril de 2010.
- NASCIMENTO, L.M. Anatomia, histoquímica e prospecção fitoquímica do caule de *Tynanthus fasciculatus* Miers (Bignoniaceae). 2008. 53 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Botânica. Viçosa, Minas Gerais, 2008.
- NICOLAS, L.B.; KOLB, Y.; PRINSSEN, E.P.M. A combined marble burying – locomotor activity test in mice: A practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. **European Journal of Pharmacology**, v.547, p.106–115, 2006.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v.14, n.3, p.149-67, 1985.
- PHARMAKO CONSULTORIA. A importância do projeto na realização do Investimento farmacêutico e cosmético. 2008. Disponível em: <<http://www.phk.com.br/destaque2.asp>>. Acesso em: 13 abr. 2011.
- PINHEIRO, A.A.; SIANI, A.C.; GUILHERMINO, J.F.; HENRIQUES, M.G.M.O.; QUANTAL, C.M.; PIZARRO, A.P.B. Metodologia para gerenciar projetos de pesquisa e desenvolvimento com foco em produtos: uma proposta. **Rev. Adm. Pública**, Rio de Janeiro, v.40, n.3, p.457-78, mai./jun. 2006.
- PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, R.A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e perspectivas. **Química Nova**. v.25, supl.1, p.45-61, 2002.
-

PLAZA, A. MONTORO, P.; BENAVIDES, A.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Phenylpropanoid Glycosides from *Tynanthus panurensis*: Characterization and LC-MS Quantitative Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.53, p.2853-2858, 2005.

PORTAL BRASIL. Indústria Farmacêutica. Tecnologia em Saúde em Ciência e Tecnologia. 09 dez 2010. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/sobre/ciencia-e-tecnologia/tecnologia-em-saude/industria-farmacautica>>. Acesso em: 30 dez. 2010.

QUEIROZ FILHO, O.A. Quanto cobrar pelos seus serviços. SEBRAE. 26 mar. 2003. Disponível em: <[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/184DC57F716DB89603256D520059BE20/\\$File/58\\_1\\_arquivo\\_quantocobrar.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/184DC57F716DB89603256D520059BE20/$File/58_1_arquivo_quantocobrar.pdf)>. Acesso em: 13 abr. 2011.

RADAELLI, V. A inovação na Indústria Farmacêutica: forças centrípetas e forças centrífugas no processo de internacionalização. 2006. 176f. Dissertação (Mestrado em Política Científica e Tecnológica) - Instituto de Geociências, Campinas, 2006.

RAINTREE NUTRITION. Descrição do produto Clavo huasca. Rain-tree Nutrition. mar. 2011. Disponível em: <<http://www.rain-tree.com/clavohuasca.htm>>. Acesso em: 22 mar. 2011.

RAMANJANEYULU, R.; TICKU, M. K. Interactions of pentylene-tetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. **Eur. J. Pharmacol.**, 98: 337-345, 1984.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. **The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology**. In: Cooper, S. J.; Hendrie, C. A. (Eds.), *Ethology and Psychopharmacology*. Wiley, Chichester, p.9-44, 1994.

RODRIGUES, E. A parceria Universidade – Empresa privada na produção de fitoterápicos no Brasil. **Revista Fármacos e Medicamentos**, São Paulo, n.37, Ano IV, p. 30-39, 2005.

ROGAWSKI, M.A.; PORTER, R.J. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. **Pharmacol. Rev.**, v.42, n.3, p.223-86, 1990.

SALEN, B.; KANNEBLEY JÚNIOR, S.; PORTO, G. S. Relatório setorial sobre inovação tecnológica na indústria farmacêutica: Uma análise a partir dos indicadores de inovação. 2007. Disponível em: <<http://www.fipase.org.br/imagens/RelatSetFarmaceuticaBrasileira.pdf>>. Acesso em: 13 jun 2011.

SARRIS, J. Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders: A systematic review. **Phytotherapy Research**, vol. 21, p.703-716, 2007.

---

- SCHMIDT, M.V.; MÜLLER, M.B. Animal models of anxiety. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v.3, n.4, 2006.
- SEBRAE. Custos na prestação de serviços. Série Saiba Mais – SEBRAE. 04 abr 2006. Disponível em: <[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/B83E6E16A0097D3A03257146005A1566/\\$File/NT000AFA42.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/B83E6E16A0097D3A03257146005A1566/$File/NT000AFA42.pdf)>. Acesso em: 13 abr. 2011.
- SHI, Y.; YAO, S.; JIA, Z.; LIN, N.; ZHENG, R. Dietary phytophenols act as scavengers of reducing radicals. **Food Chemistry**, v.124, p.1322-1327, 2011.
- SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª Ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007.
- SOUZA, L.A.; SANTOS, G.O.; MOSCHETA, I.S. Morfoanatomia floral de espécies lianescentes de Bignoniaceae. **IHERINGIA, Sér. Bot.**, Porto Alegre, v.65, n.1, p.5-15, jun. 2010.
- SOUZA, M.V.N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v.27, n. 2, p. 308-312, 2004.
- STÉRU, L. CHERMAT, R.; THIERRY, B., SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacol.**, v.85, p. 367-370, 1985.
- SWINYARD, E.A.; BROWN, W.C.; GOODMAN, L.S. Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.106, n.3, p.319-330, 1952.
- TAO, G.; IRIE, Y.; LI, D.J.; KEUNG, W.M. Eugenol and its structural analogs inhibit monoamine oxidase A and exhibit antidepressant-like activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.13, n.15, p.4777-4788.
- TORRES, R.P.; SOUZA, M.A.F. Estratégia em organizações – Visão Baseada em Recursos: Estratégia Competitiva de um Laboratório Nacional no Mercado Farmacêutico. In: XIII SEMEAD – SEMINÁRIOS EM ADMINISTRAÇÃO, set. 2010. Disponível em: <<http://www.ead.fea.usp.br/semead/13semead/resultado/trabalhosPDF/1001.pdf>>. Acesso em: 01 dez 2010.
- TUROLLA, F.A.; DE LIMA, M.F.F. Aché: deveria um laboratório nacional fazer diferente? **Central de cases**, mai. 2007. Disponível em: <[www.espm.br/Publicacoes/CentralDeCases/Documents/ACHE.pdf](http://www.espm.br/Publicacoes/CentralDeCases/Documents/ACHE.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2010.
- UDULUTSCH, R.G. Composição florística da comunidade de lianas lenhosas em duas formações florestais do Estado de São Paulo. 2004. 114 f. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.
-

VALERIANO, D. Gerência em projetos de pesquisa, desenvolvimento e engenharia. São Paulo: **Makron Books**, 1998.

VAN DER STAAY, F. J. Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. **Brain Research Reviews**, v.52, p.131-159, 2006.

VIEIRA R.A. Avaliação da possível atividade central da *Stachytarpheta cayenensis* (gervão-roxo). Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

VIERGAS JR., C.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

VILEGAS, W.; POZETTI, G.L.; VILEGAS, J.H.Y.; LLABRÈS, G. Chemical study of Brazilian medicinal plants. II. *Tynanthus fasciculatus* Miers. **Fitoterapia**, v.64, n.5, p.476-476, 1993.

VILEGAS, W.; VILEGAS, J.H.Y.; POZETTI, G.L.; MORENO, R.M. The chemistry of cipo-cravo - *Tynanthus fasciculatus*. **Revista Latinoamericana de Química**, v.23, n.2, p.47-49, 1994.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, vol. 16, p.97-110, parte I. 2009.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, vol. 16, p.97-110, parte I. 2009.

WIKINVEST. Central Nervous System Drug Market. 2010. Disponível em: <[http://www.wikinvest.com/wiki/Central\\_Nervous\\_System\\_Drug\\_Market](http://www.wikinvest.com/wiki/Central_Nervous_System_Drug_Market)>. Acesso em: 03 abr 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Mental health. Set. 2006. Disponível em: <[http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/definition/en/](http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/)>. Acesso em: 22 out 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Mental health: strengthening mental health promotion. Set. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs220/en>>. Acesso em: 22 out 2009.

ZHANG, Z. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. **Life Sciences**, v. 75, p.1659-1699, 2004.

ZORUMSKI, C. F.; ISENBERG, K. E. Insights into the structure and function of GABA benzodiazepine receptors: ion channels and psychiatry. **Am. J. Psychiatry**, v.148, n.2, p.162-73, 1991.

---

## ANEXO I – Aprovação do protocolo experimental do estudo na CEUA-UFSC e UNIPAR.

### Resultado de Solicitação de Protocolo

**Protocolo**

PP00415

**Título**

Avaliação pré-clínica de plantas com atividade ansiolítica e antidepressiva

**Data de Entrada**

21/10/2010

**Resultado:**

Aprovado

**Data/Prazo**

17/12/2010

**Considerações**

Ofício nº 257/CEUA/PRPE/2010

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Thereza Christina Monteiro de Lima, Departamento de Farmacologia – CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO ad referendum, por um ano(s), para a utilização de cento e sessenta camundongos (*Mus musculus*).

- Procedência do animal: Biotério da UNIPAR.

- Processo cadastrado sob o número: 23080.040914/2010-46

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**  
**Data 17/03/2012**

Data 17/12/2010

**Parecer(es):**

**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC**  
**PRESIDENTE**



## UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR

Reconhecida pela Portaria - MEC Nº 1580, DE 09/11/93 - D.O.U. 10/11/93

Mantenedora: Associação Paranaense de Ensino e Cultura - APEC

DIRETORIA EXECUTIVA DE GESTÃO DA PESQUISA E DA PÓS GRADUAÇÃO  
COORDENADORIA DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA - COPIC



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEPEEA)

### CERTIFICADO

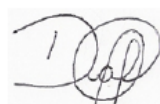
Certificamos que o projeto "Aplicação de métodos comportamentais na avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva de medicamentos inovadores numa indústria farmacêutica", protocolo 18597/2010, sob a responsabilidade de CRISTIANE LOIVA REICHERT, está de acordo com os Princípios éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR) em reunião realizada em 17/06/2010. Este certificado expira em 17/06/2011.

We certify that the project "Aplicação de métodos comportamentais na avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva de medicamentos inovadores numa indústria farmacêutica", protocol 18597/2010, in the responsibility of CRISTIANE LOIVA REICHERT, is in agreement with the Ethical Principles in Animal adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH OF UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR) in 06/17/2010. Expiration date: 06/17/2011.

TOLEDO - PR, 17/06/2010.

  
 Prof. Msc. Juliana Silveira do Valle  
 Presidente CEPEEA/UNIPAR

Registro Nº: 18597

  
 Dayane Aparecida Fagiolo  
 Secretária CEPEEA/UNIPAR



ANEXO II- Formulário de triagem hipocrática do Laboratório de Neurofarmacologia – UFSC.

**TRIAGEM FARMACOLÓGICA COMPORTAMENTAL**

**PLANTA UTILIZADA:**\_\_\_\_\_ **DOSES:**\_\_\_\_\_

**DATA**\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ **VIA DE ADMINISTRAÇÃO:**\_\_\_\_\_

**ANIMAIS:**\_\_\_\_\_ **RESPONSÁVEL :**\_\_\_\_\_

**GRUPOS EXPER.:**\_\_\_\_\_

ATIVIDADE  
FARMACOLÓGICA

Quantificação dos efeitos: sem efeito, (-) efeito  
diminuído,  
(+) efeito presente, (++) efeito intenso

	até 30'	1h	2h	3h	24h
<b>1 - SNC</b>					
<b>a - Estimulante</b>					
Hiperreatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
<b>b - Depressora</b>					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
<b>c - Outros comportamentos</b>					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Auto-limpeza					

Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
<b>2 - SN AUTÔNOMO</b>					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar (preensão)					
<b>3 - MORTE</b>					